PHARMAKOKINETIK VON DIGOXIN BEIM KANINCHEN NACH EINMALIGER UND WIEDERHOLTER VERABREICHUNG

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
GERHARD BALES
aus Trier

Bonn 1977

PHARMAKOKINETIK VON DIGOXIN BEIM KANINCHEN NACH EINMALIGER UND WIEDERHOLTER VERABREICHUNG

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
GERHARD BALES
aus Trier

Bonn 1977

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. G. Bodem
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Simon

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
Bonn-Venusberg
Direktor: Prof. Dr. H. J. Dengler

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: R. Schwarzbold, 5305 Witterschlick, Geltorfstr. 52

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

EINLEITUNG..... 5

METHODIK..... 7
I. Substanzen..... 7
II. Versuchstiere..... 7
III. Durchführung der Versuche..... 8
1. Versuche mit nicht markiertem Digoxin..... 8
a. Einmalige Injektion..... 8
b. Langzeitversuch..... 8
2. Versuch mit markiertem Digoxin..... 8
IV. Weiterverarbeitung der Proben..... 10
1. Messung der Radioaktivität in Serum, Urin und Stuhl..... 10
2. Bestimmung des Tritiumwassers (HTO)..... 11
3. Aufarbeitung des Urins..... 11
4. Aufarbeitung des Serums..... 13
5. Radioimmunologische Digoxinbestimmung..... 13
V. Rechnerische Auswertung..... 15

ERGEBNISSE..... 17
I. Versuche mit nicht markiertem Digoxin..... 17
1. Kinetik..... 17
2. Langzeitversuch..... 18
II. Versuch mit markiertem Digoxin..... 20
1. Kinetik..... 20
2. Stoffwechseluntersuchungen..... 23

DISKUSSION..... 27

ZUSAMMENFASSUNG..... 44

TABELLEN..... 46

LITERATUR..... 51

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523717_0061

EINLEITUNG

Die Herzglykoside gehören auch heute noch zu den wichtigsten Arzneimitteln, die uns zur Verfügung stehen. In den USA werden etwa 20 % der erwachsenen Patienten, die einer ständigen ärztlichen Betreuung bedürfen, mit Digitalis behandelt (22). Wegen der steigenden Lebenserwartung scheint diese Patientengruppe eher noch im Zunehmen begriffen zu sein. Etwa 8 - 35 % der mit Digitalis über längere Zeit behandelten Patienten entwickeln eine Digitalisintoxikation (9, 22, 24, 30, 32, 43, 47, 65, 66, 75, 81, 85, 89). Die Mortalität dieser Komplikation wird mit 3 - 21 % angegeben (41, 75, 81, 94). Diese Zahlen machen das große Interesse verständlich, das Praktiker, Kliniker und Pharmakologen Untersuchungen mit Herzglykosiden entgegenbringen.

Bereits lange bevor man Blutspiegel und Urinkonzentrationen von Digitalis beim Menschen bestimmen konnte, gab es sehr brauchbare Vorstellungen über die Dosierung von diesen Substanzen. Man ging dabei im allgemeinen von der Wirkung einer oral oder intravenös verabreichten Dosis auf die Herzinsuffizienz und Flimmerarrhythmien aus. Die Studien von Battermann und De Graff (4) über die Wirkung von oral verabreichtem Lanatosid C, Digoxin und Digitoxin auf die Herzinsuffizienz ermöglichten es, genauere Richtlinien für die Dosierung dieser Glykoside auszuarbeiten. Augsberger (2, 3) nahm ihre Ergebnisse als Grundlage der Berechnung wesentlicher therapeutischer Parameter. Von ihm stammen die Begriffe "Wirkspiegel", "Vollwirkspiegel" und "Abklingquote", die in der Therapie mit Herzglykosiden eine große Rolle spielen.

Weitere Impulse erhielten Untersuchungen über die Pharmakokinetik durch die Entwicklung des Bioassay (25) sowie chromatographischer (44, 45, 100, 101), fluorimetrischer (46, 82) und polarographischer (42) Methoden zur Bestimmung der Herzglykoside in Körperflüssigkeiten. Entscheidenden Anteil daran hatten in den 50^{er} und 60^{er} Jahren insbesondere Studien über das Verhalten radioaktiv markierter Glykoside im menschlichen Organismus (21).

Diese Methoden hatten jedoch den Nachteil, für die klinische Routine entweder zeitlich oder apparativ zu aufwendig zu sein. Erst mit Einführung des empfindlichen Radioimmunoassay durch Smith, Butler und Haber im Jahre 1969 (86) wurde es möglich, nicht markierte Glykoside genau und schnell zu bestimmen. Mit Hilfe dieser Technik und des Rubidium-uptake-assays (6, 7, 33) gelang es in den letzten Jahren, exakte pharmakokinetische Messungen vorzunehmen.

Wenn auch bereits zahlreiche Untersuchungen über die Pharmakokinetik nach akuter Verabreichung von Herzglykosiden beim Menschen vorliegen, so fehlt es noch immer an repräsentativen Daten unter einer Dauerbehandlung. Studien dieser Art erfordern häufige Blutentnahmen sowie Urinsammlungen und sind deshalb für den betreffenden Patienten belastend.

Um entsprechende Hinweise für das Verhalten von Digoxin unter einer chronischen Therapie beim Kaninchen zu erhalten, haben wir Verteilung, Ausscheidung und Metabolisierung dieser Substanz nach einmaliger und wiederholter intravenöser Verabfolgung untersucht.

METHODIK

I. Substanzen

^{3}H-Digoxin war am C_{12} des Genins nach der von v. Wartburg et al. (99) beschriebenen Methode in α-Stellung mit Tritium markiert. Das Präparat lag in alkoholischer Lösung in abgeschmolzenen Ampullen zu 1,3 ml vor. Die spezifische Aktivität betrug 2160 μC/mg (entsprechend 540 μC/ml) [1].
An nicht markiertem Digoxin verwendeten wir Novodigal^R der Firma Beiersdorf, Ampullenlösung, Charge Nr. 763, 0,4 mg Digoxin/2 ml.
Weiterhin injizierten wir ß-Methyl-Digoxin (Lanitop^R, Firma Böhringer, Mannheim, Ampullenlösung, 0,2 mg/2 ml).
Zur dünnschichtchromatographischen Identifizierung wurden folgende "Kaltsubstanzen" von der Firma Böhringer, Mannheim zur Verfügung gestellt:
Digoxin
Digoxigenin-bis-digitoxosid
Digoxigenin-mono-digitoxosid
Digoxigenin
Dihydrodigoxigenin.

II. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden ausschließlich an gesunden, etwa ein Jahr alten männlichen und weiblichen Kaninchen durchgeführt, deren Gewicht wenigstens 3 kg betrug.
Während der Stoffwechseluntersuchungen (= Versuche mit ^{3}H-Digoxin) hielten wir die Tiere über die gesamte Versuchsdauer in Stoffwechselkäfigen (Firma Dipl. Ing. W. Ehret, Emmendingen), um Urin und Stuhl getrennt auffangen zu können. Vor Versuchs-

1) Für die Überlassung der markierten Substanzen danken wir der Sandoz AG, Basel, Abtlg. für Experimentelle Therapie.

beginn waren die Kaninchen mindestens 4 Tage in den Käfigen untergebracht und hatten sich so an die Umgebung und das täglich verabreichte Trockenfutter (Kaninchen-Standart-Diät, Firma Altromin, Lage) gewöhnen können.

III. Durchführung der Versuche

1. Versuche mit nicht markiertem Digoxin

a. Einmalige Injektion:

5 erwachsenen weiblichen Kaninchen mit einem mittleren Gewicht von 3346 g wurden jeweils 0,8 mg Digoxin in einer einzigen Bolusinjektion intravenös in die laterale Ohrvene injiziert. Die Blutentnahme erfolgte ebenfalls über eine Ohrvene nach einer Behandlung des Ohres mit Diäthyläther. Die Entnahme der Blutproben fand unmittelbar vor der Applikation (Leerwert) sowie 1/2, 1, 1 1/2, 2, 2 1/2, 3 1/2, 4, 4 1/2, 5, 5 1/2, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 21 und 25 Stunden nach der Injektion des Medikamentes statt. Wir zentrifugierten das Blut 10 Minuten lang bei 4000 U/min. Anschließend wurde das Serum bis zur radioimmunologischen Analyse eingefroren.

b. Langzeitversuch:

8 weibliche Kaninchen mit einem mittleren Gewicht von 3360 g und 5 männliche Kaninchen mit einem mittleren Gewicht von 3523 g erhielten an 7 aufeinanderfolgenden Tagen je eine tägliche intravenöse Injektion von 0,8 mg Digoxin. Die Blutproben wurden jeweils 12 und 24 Stunden nach jeder Injektion in der oben beschriebenen Weise abgenommen und das gewonnene Serum eingefroren.

Nach dem gleichen Schema injizierten wir 4 männlichen Kaninchen mit einem mittleren Gewicht von 3668 g über eine Woche täglich 0,8 mg ß-Methyl-Digoxin und gewannen die Blutproben zu den entsprechenden Zeiten.

2. Versuch mit markiertem Digoxin

6 weiblichen und 2 männlichen Kaninchen mit einem mittleren Körpergewicht von 3575 g wurden in einer ersten Injektion (1. Tag) 0,2 mg Digoxin pro kg Körpergewicht injiziert. In

dieser Gesamtdosis von 0,2 mg/kg waren 0,1 mg ^{3}H-Digoxin enthalten, was einer Aktivität von 216 μC entsprach. Die Entnahme der Blutproben erfolgte unmittelbar vor (Leerwert) und 1/4, 1/2, 3/4, 1, 1 1/2, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 24, 30, 36, 48, 72 und 96 Stunden nach der intravenösen Applikation. Urin und Stuhl wurden getrennt und quantitativ in Perioden von 0-24, 24-48, 48-72 und 72-96 Stunden gesammelt. Vom 5. bis 12. Tag erhielten die Tiere je eine tägliche intravenöse Injektion von 0,2 mg "kaltem" Digoxin pro kg Körpergewicht. Am 13. Tag erfolgte, nachdem vorher eine Blutprobe (2. Leerwert) entnommen worden war, die letzte Injektion von 0,2 mg/kg Digoxin, wobei wiederum in der Gesamtdosis 0,1 mg ^{3}H-Digoxin enthalten waren. Anschließend wurden Blutproben, Urin und Stuhl zu den gleichen Zeiten und über den gleichen Zeitraum gewonnen wie nach der ersten Injektion. Serum, Urin und Stuhl wurden bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Abbildung 1 illustriert den Versuchsaufbau.

Abb. 1: Versuchsaufbau für den Versuch mit ^{3}H-Digoxin. Die Pfeile kennzeichnen die Injektionstage.

Bei der Herstellung des Injektionsgemisches aus "kaltem" und markiertem Digoxin wurde im einzelnen so vorgegangen, daß zunächst nach dem aktuellen Gewicht der Kaninchen die jeweils zu injizierende Gesamtmenge an Digoxin (0,2 mg/kg) errechnet wurde. Mittels einer Eppendorfpipette pipettierten wir 0,4 ml ^{3}H-Digoxin (= 0,1 mg, 216 μC) aus den Ampullen in ein sauberes Glasgefäß. Dem markierten Digoxin wurde soviel an "kaltem" Digoxin zugesetzt, daß die zu injizierende Gesamtmenge 0,2 mg/kg betrug. Mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung wurde auf ein Injektionsvolumen von 8 ml ergänzt, die intravenös injiziert wurden. Pipettenspitzen, Nadel und Spritzen, die zur Herstellung und Injektion des Gemisches erforderlich waren, wurden anschließend in einem Becherglas mit 100 ml Methanol gewaschen, dessen Tritiumaktivität gezählt wurde. Diese wurde zur Ermittlung der tatsächlich injizierten Dosis von der ursprünglich in 0,4 ml ^{3}H-Digoxin-Lösung enthaltenen Ausgangsaktivität abgezogen.

IV. Weiterverarbeitung der Proben

1. Messung der Radioaktivität in Serum, Urin und Stuhl

Die Messung der Tritiumaktivität erfolgte in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Liquid szintillation system, isocap 300, Nuclear Chicago). Der Löscheffekt wurde durch automatische externe Standardisierung korrigiert. Alle Proben wurden doppelt und für 10 Minuten gezählt.
Als Szintillationsflüssigkeit dienten 10 ml Insta-Gel (Packard Instrument Company), denen 0,1 ml Serum zugegeben wurde.
Die Radioaktivität des Urins wurde mit Hilfe von Unisolve (Szintillation Chemical, Koch-Light-Laboratories Ltd.) als Szintillator bestimmt (0,5 ml Urin / 10 ml Unisolve).
Stuhlproben wurden gewogen und in einem Tri-Carb-Sample-Oxydizer der Firma Packard verbrannt. Die Radioaktivität des Rückstandes wurde anschließend in 16 ml Monophase (Packard) als Szintillationsflüssigkeit gezählt. Aus Stuhlgewicht pro Zeiteinheit und Zählrate errechneten wir die ausgeschiedene Aktivität.

2. Bestimmung des Tritiumwassers (HTO)
Von 1 ml Serum oder Urin wurde durch Gefriergetrocknung das Tritiumwasser abgetrennt, in einer Kühlfalle aufgefangen und in 10 ml des von Bray (10) angegebenen Szintillationscocktails gemessen.

3. Aufarbeitung des Urins (Abb. 2)
Nach Filtration (Selecta Faltenfilter Nr. 595 1/2, Firma Schleicher u. Schüll) wurden 10 ml jeder Probe bei pH 7,4 mit dem doppelten Volumen Chloroform (20 ml) zur Extraktion der Radioaktivität zweimal für 20 Minuten mit einem Magnetrührer in einer Schüttelflasche gerührt. Nach jedem Rührprozeß wurde die Tritiumaktivität in der wässrigen Phase bestimmt. Die Chloroformextrakte wurden zur Trockne gebracht und vereinigt. Dann pipettierten wir 5000 Fishman-Einheiten Glucuronidase-Sulfatase (ß-Glucuronidase-steroid-Sulfatase-Lösung, ca. 100 000 FE/ml, Firma Serva) zu der wässrigen Phase und stellten das pH mit Salzsäure auf 4,2 ein. Die sich anschließende Inkubation bei 37° C dauerte 24 Stunden. Danach extrahierten wir wieder in der oben beschriebenen Weise bei pH 7,4 mit Chloroform, bestimmten nach jedem Rührprozeß die Radioaktivität in der wässrigen Phase und evaporierten die Chloroformphase. Anschließend wurde die wässrige Phase mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 gebracht und für eine halbe Stunde gekocht. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur stellten wir das pH mit 1 N Natronlauge auf 7,4 ein und extrahierten nochmals wie bereits angeführt.
Die evaporierten Chloroformextrakte wurden in 1 ml Äthanol aufgenommen, in ein Spitzröhrchen pipettiert und wiederum eingedampft. Der Rückstand wurde mit 0,2 ml Äthanol in Lösung gebracht und mittels einer Hamilton-Spritze auf eine Kieselgelplatte (0,2 mm Schichtdicke, 20 x 20 cm, Firma Merck) aufgetragen. Als Fließmittel verwendeten wir ein Gemisch, das sich aus 90 Teilen Chloroform, 9,25 Teilen Methanol und 0,75 Teilen Wasser zusammensetzte. Die Dünnschichtplatten wurden an einem Dünnschichtscanner ausgewertet (Firma Berthold-Frische, Modell LB 2560 2π).

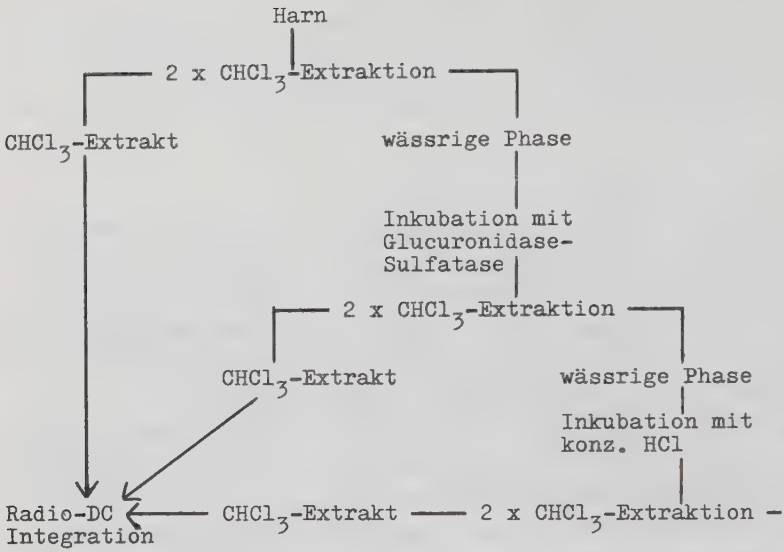


Abb. 2: Aufarbeitung des Urins nach der Gabe von ^{3}H-Digoxin.

Da in dem Fließmittel keine Trennung der das Digoxigenin enthaltenden Metabolite von der Ausgangssubstanz zu erwarten war, wurden die radioaktiven Banden ausgekratzt, in Äthanol aufgeschwemmt und ausgerührt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand zur Trockne gebracht. Das Evaporat wurde in 0,2 ml Äthanol aufgenommen und auf einer Kieselgelplatte rechromatographiert, wobei als Fließmittel ein Gemisch aus 50 Teilen Xylol und 50 Teilen Äthylmethylketon diente. Radioaktive Substanzen und nicht radioaktive Reinsubstanzen liefen parallel. Bei den nicht markierten Substanzen wurde zur Sichtbarmachung nach dem von Kaiser (50) angegebenen Verfahren ein Chloramin-Trichloressigsäurespray benutzt (4 Teile 25% -ige Trichloressigsäure-Lösung in 96 vol% -igem Äthanol, 1 Teil 3% -ige

wässrige Chloramin-T-Lösung). Die luftgetrockneten Platten wurden besprüht und 7 Minuten lang im Trockenschrank bei 110° C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur zeigten sich blauviolette Flecken im ultravioletten Licht. Die Zuordnung der Tritiumaktivität in der jeweils untersuchten Probe erfolgte durch Orientierung an den durch UV-Fluoreszenz sichtbar gemachten mitgelaufenen inaktiven Referenzsubstanzen.

4. Aufarbeitung des Serums

3 g XAD-2 (Servachrom-XAD, Adsorberharz, Type 2, Firma Serva) wurden in destilliertem Wasser (Ampuwa^{R}, Fresenius) aufgeschwemmt und in kleine Glassäulen mit eingearbeiteter Fritte geschichtet (Glassäule mit Fritte G II, Schliff NS 14,5/23, Ø 13 mm). Dann wurde 1 ml Serum aufgetragen, mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung nachgewaschen und mit 5 ml 96 vol% -igem Äthanol eluiert. Das Eluat dampften wir unter Luft ein, nahmen den Rückstand in 5 ml 10 %-iges Äthanol auf und extrahierten anschließend mit dem doppelten Volumen Chloroform (10 ml) für 2 x 20 Minuten. Die Chloroformextrakte wurden evaporiert und, wie bereits bei der Aufarbeitung des Urins ausgeführt, dünnschichtchromatographiert.

5. Radioimmunologische Digoxinbestimmung

Methodisch gingen wir dabei nach dem von Smith und Haber (88) beschriebenen Verfahren analog zu der radioimmunologischen Insulinbestimmung vor (104). Wir benutzten den von der CIS-Gruppe (Cea Ire Sorin) angebotenen Reagenziensatz DIGOK (Isotopen Dienst West GmbH, Sprendlingen) und stellten die Reagenzien entsprechend der Arbeitsanleitung her. Den Assay änderten wir bezüglich der empfohlenen Mengen ab. Zur Kontrolle bestimmten wir in jedem Ansatz ein Kontrollserum mit bekannter Digoxinkonzentration mit. Alle Proben wurden doppelt angesetzt. Abbildung 3 zeigt die verschiedenen Arbeitsschritte.

Abb. 3: Testansatz für den Radioimmunoassay.

T = Gesamtaktivität
O = Nullwert
A_1 - A_5 = Eichlösungen
S_x = Proben

Arbeitsschritt	Reagenz	Teströhrchen (Angaben in ml) T	O	A_1-A_5	S_x
1	Puffer	0,80	0,70	0,60	0,70
2	Humanserum	0,10	0,10	0,10	-
3	Kaninchenserum	-	-	-	0,10
4	Eichlösung	-	-	0,10	-
5	^{3}H-Digoxin	0,05	0,05	0,05	0,05
6	MISCHEN (Vibriermaschine)				
7	Antiserum	-	0,10	0,10	0,10
8	MISCHEN (Vibriermaschine)				
9.	60 MINUTEN INKUBATION BEI ZIMMERTEMPERATUR				
10.	Dextranaktivkohle	-	0,50	0,50	0,50
11.	MISCHEN (Vibriermaschine)				
12.	15 MINUTEN INKUBATION BEI ZIMMERTEMPERATUR				
13.	3 x 2 MINUTEN ZENTRIFUGIEREN (Laborzentrifuge Eppendorf 3000)				

1 ml des Überstandes (siehe Arbeitsschritt 13) wurde in Bray-Szintillator (10) gezählt. Aus der Durchschnittszählrate (DZR) jeder Doppelprobe wurde die Bindungskapazität (BK) des Analysesystems errechnet als:

$$BK\ (\%) = \frac{DZR_O}{DZR_T} \times 100$$

(DZR_O = DZR des Nullwertes, DZR_T= DZR der Gesamtaktivität) Diese sollte zwischen 30 und 65 % liegen. Die Durchschnittszählrate der Eichlösungen A_1 - A_5 wurde gegen ihre jeweilige Eichkonzentration aufgetragen. (Abszisse: Digoxingehalt in ng/ml, Ordinate: Logarithmus der DZR). Die Bestimmung der Digoxinkonzentrationen in den Serumproben erfolgte durch Ablesen auf der Eichkurve.

V. Rechnerische Auswertung

Die Mittelwerte $\bar{x}$ sowie die mittleren Abweichungen der Mittelwerte $s_{\bar{x}}$ und SEM wurden nach Standardprogramm auf einem Olivetti-Tischrechner Programma 602 ermittelt.
Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde der Student-Test (t-Test) für ungepaarte Kollektive angewendet.
Die Blutspiegelkurven wurden regressionsanalytisch auf einem Computer [1] approximiert. Wir gingen dabei von der Annahme aus, daß sich die Plasmakonzentrationszeitkurven nach Gabe von Herzglykosiden nur unbefriedigend mit einer einfachen e-Funktion annähern lassen. Dementsprechend wurde jeder Datensatz durch gewichtete, nicht-lineare Regression unter Berücksichtigung der kleinsten Abweichungsquadrate (59, 96) zunächst mit einer Funktion der Form

$$C(t) = A_1 e^{-\gamma_1 t} + A_2 e^{-\gamma_2 t} + A_3 e^{-\gamma_3 t} \qquad (1)$$

verglichen, wobei C(t) die Serumkonzentration zur Zeit t und t die Zeit nach der Injektion bedeuten. Die Koeffizienten A_{1-3} und γ_{1-3} wurden solange variiert, bis die Summe der Abweichungsquadrate der Differenz zwischen errechneter und gemessener Kurve den kleinsten Wert hatte. Im einzelnen wurde dabei so vorgegangen, daß jeder verbleibende Fehler mit einem Faktor "gewichtet" wurde, der zunächst die reziproke Konzentration darstellte. Erwies sich die daraus errechnete Annäherungsfunktion noch als zu ungenau, wurde der Reziprokwert der Quadratwurzel der Konzentration als "Wichtungsfaktor" benutzt. Wenn sich auch dann noch keine befriedigende Annäherung ergab, versuchten wir, die Kurve mit einer Funktion der Form

1) Programm: NLIN--Nonlinear least squares estimation of parameters (96).

$$C(t) = A_1 e^{-\gamma_1 t} + A_2 e^{-\gamma_2 t} \qquad (2)$$

zu beschreiben. Wir wählten schließlich die Funktion als die geeignetste aus, die die gemessenen Daten am genauesten approximierte. Anschließend berechneten wir die folgenden pharmakokinetischen Parameter:

- Halbwertzeit in der Verteilungsphase $t_{1/2\gamma_1}$
- Eliminationshalbwertzeit $t_{1/2\gamma_3}$
- Volumen des Zentralen Kompartimentes V_1
- Verteilungsvolumen nach der Flächenmethode V_d
- Totale Clearance
- Eine weitere Halbwertzeit $t_{1/2\gamma_2}$ wurde dann berechnet, wenn eine Dreierexponentialsumme die gemessene Kurve am genauesten beschrieb.

Zur Berechnung des Verteilungsvolumens nach der Flächenmethode (V_d) mußte die von Achsenkreuz und Serumspiegelkurve umschlossene Fläche bestimmt werden. Die Neigung der letzten Exponentialen wurde zur Extrapolation auf $t = \infty$ benutzt. Die Fläche wurde durch Integration gewonnen.

ERGEBNISSE

I. Versuche mit nicht markiertem Digoxin

1. Kinetik

Abbildung 4 zeigt die Mittelwertskurve der Digoxinplasmakonzentrationen von 5 Kaninchen nach intravenöser Verabreichung von 0,8 mg Digoxin. Die Plasmaspiegel fallen zunächst schnell und dann zunehmend langsamer ab. Etwa von der 10. Stunde ab nehmen die Konzentrationen bei halblogarithmischer Auftragung bis zum Ende der Meßperiode linear mit der Zeit ab. Nach 30 Minuten erreichten die Spiegel ihren Maximalwert bei 42,80 ± 5,03 ng/ml.

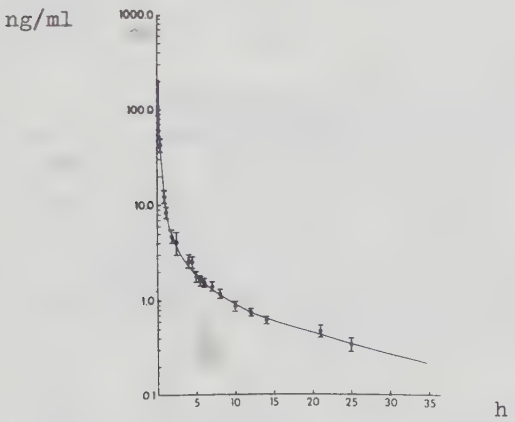


Abb. 4: Plasmaspiegel nach i.v.-Gabe von 0,8 mg Digoxin (Radioimmunoassay). Punkte: Mittelwerte (± SEM) von 5 weibl. Kaninchen. Durchgezogene Linie: Mittels Computer approximierte Kurve.

Regressionsanalytisch ließen sich die Plasmakonzentrationszeitkurven bei vier von fünf Kaninchen durch eine Summe von 3 Exponentialtermen beschreiben:

$$C(t) = A_1 e^{-\gamma_1 t} + A_2 e^{-\gamma_2 t} + A_3 e^{-\gamma_3 t} \qquad (3).$$

Diese Approximation gelang auch, wenn die Mittelwertskurve (Abb. 4) zugrunde gelegt wurde. (Tab. 1). Die Blutspiegelkurve von Tier Nr. 8 paßte besser zu einer biexponentialen Funktion, und zwar möglicherweise deshalb, weil nur zu wenigen Zeiten Blut abgenommen wurde (Tab. 1). In den späten Zeiten nähern sich die beiden ersten Glieder der Gleichung (3) 0, und der weitere Verlauf der Blutspiegelkurve ist bestimmt durch

$$C(t) = A_3 e^{-\gamma_3 t} \qquad (4).$$

Aus dem Exponenten γ_3 errechneten wir die Eliminationshalbwertzeit $t_{1/2\,\gamma_3}$, die 14,76 Stunden dauerte. Die Halbwertzeiten in den "schnellen" γ_1 - und γ_2 - Phasen betrugen 0,25 und 1,76 Stunden (Tab. 1).
Sowohl das Volumen des Zentralen Kompartimentes (V_1) als auch das Verteilungsvolumen nach der Flächenmethode (V_d) überstiegen das Körpergewicht (V_1 = 1,71 Liter/kg, V_d = 50,81 Liter/kg). Die mittlere totale Clearance betrug 142 ml/min. (Tab. 1).
Die Ergebnisse der Mittelwerte der einzelnen pharmakokinetischen Parameter stimmten recht gut mit jenen Daten überein, die aus der Mittelwertskurve (Abb. 4) der betreffenden Plasmakonzentrationen errechnet wurden (Tab. 1).

2. Langzeitversuch

Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte der Plasmadigoxinkonzentrationen von 8 weiblichen und 5 männlichen Kaninchen bei 7-tägiger intravenöser Injektion von 0,8 mg Digoxin täglich 12 und 24 Stunden nach jeder Applikation. Bei jeder Gruppe wurden für den betreffenden Zeitpunkt die Plasmakonzentrationen vorausberechnet, die sich bei Anwendung der unten beschriebenen Mehrfach-Dosis-Kinetik auf die mittlere Konzentration nach der

ersten Dosis ergeben müßten. Dabei lag die Annahme zugrunde, daß die terminale Phase der Elimination oder ß-Phase der Kurve erreicht sei. Im Gegensatz zu den erwarteten vorausberechneten Werten fielen die Konzentrationen jedoch progredient bei wiederholter Applikation und erreichten schließlich Werte, die signifikant unter den errechneten lagen. Bei den 8 weiblichen Kaninchen (Tab. 2 und Abb. 5) fielen die 12h-Konzentrationen von 0,62 ng/ml nach der ersten Injektion auf 0,23 ng/ml nach der siebten Dosis. Die vorausberechneten Werte lagen am siebten Tag bei 0,70 ng/ml. Die 24h-Werte verhielten sich entsprechend. Dieses Phänomen traf nicht nur für Digoxin zu, sondern es fand sich auch bei mehrtägiger Injektion von ß-Methyl-Digoxin.

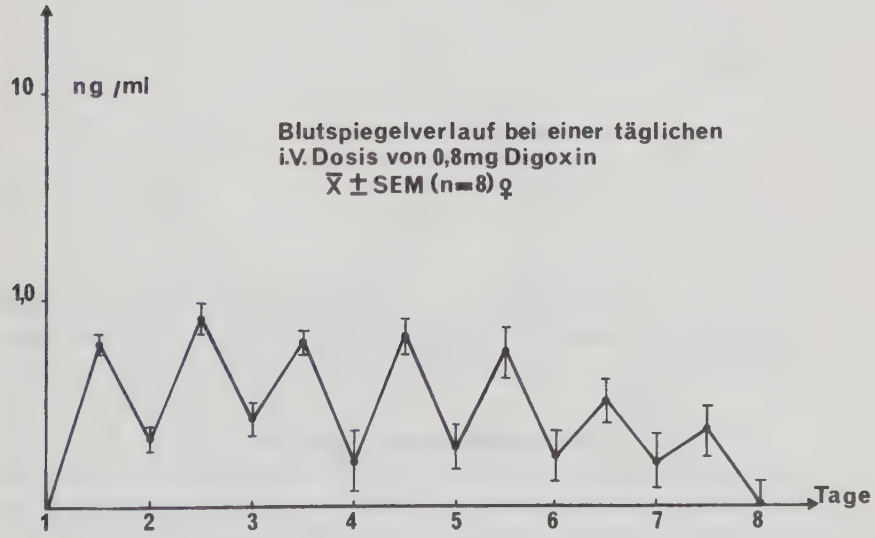


Abb. 5

II. Versuch mit markiertem Digoxin

1. Kinetik

Die Plasmaspiegel der Tritiumaktivität zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die radioimmunologisch bestimmte Digoxinkonzentrationszeitkurve (vergl. Abb. 4 u. 6). Die Kurven nach der ersten (Tag 1) und zweiten (Tag 13) Injektion von ^{3}H-Digoxin waren nahezu identisch (Abb. 6 u. 7). Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der markierten Substanz und der insgesamt injizierten Glykosidmenge errechneten sich nach 15 Minuten Maximalspiegel von 140 ng/ml. Die Berechnung geht allerdings davon aus, daß die Radioaktivität der unveränderten Substanz entspricht. Die Spiegel lagen nach 30 Minuten zwischen 60 und 100 ng/ml.

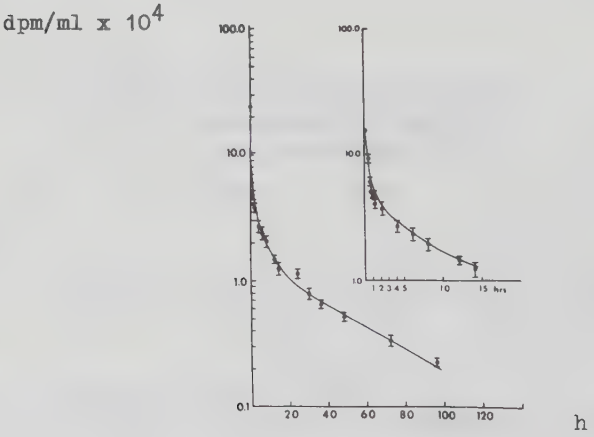
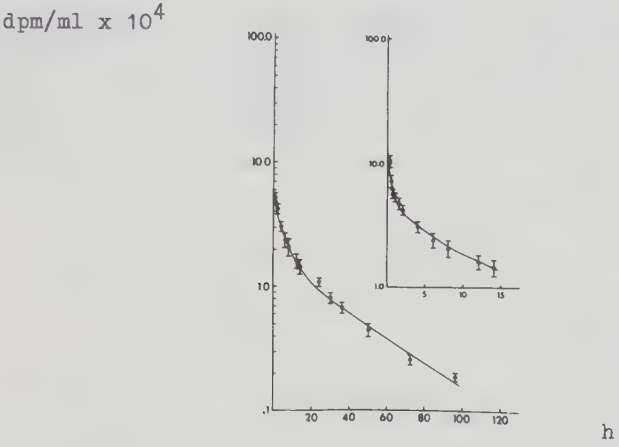


Abb. 6: Radioaktivität im Plasma nach i.v.-Gabe von 216 µC ^{3}H-Digoxin (1. Injektion). Punkte: Mittelwerte (± SEM) von 6 weibl. und 2 männl. Kaninchen. Durchgezogene Linie: Mittels Computer approximierte Kurve. Das kleinere Diagramm verdeutlicht den Verlauf während der ersten 15 Stunden.

Abb. 7: Radioaktivität im Plasma nach i.v.-Gabe von 216 µC ^{3}H-Digoxin (2. Injektion). Punkte: Mittelwerte (± SEM) von 6 weibl. und 2 männl. Kaninchen. Durchgezogene Linie: Mittels Computer approximierte Kurve. Das kleinere Diagramm verdeutlicht den Verlauf während der ersten 15 Stunden.



Auch hier ließen sich die Kurven am genauesten durch eine Summe von 3 Exponentialfunktionen approximieren, entsprechend Gleichung (3). Die einzige Ausnahme war Tier Nr. 6 nach der ersten Dosis (Tab. 3).

Es bestand eine gute Übereinstimmung zwischen den Mittelwerten der pharmakokinetischen Parameter der Einzeltiere und den Parametern, die sich aus den jeweils vorher errechneten Mittelwerten der Plasmaaktivitäten ergaben. Im einzelnen betrugen die pharmakokinetischen Parameter nach beiden Injektionen (Tab. 3 u. 4):

- Eliminationshalbwertzeit ($t_{1/2\gamma_3}$) 33,92 (43,12) Stunden
- Halbwertzeiten in den "schnellen" γ_1 - und γ_2 - Phasen ($t_{1/2\gamma_1}$ bzw. $t_{1/2\gamma_2}$) 0,18 bzw. 4,12 (0,29 bzw. 2,21) Stunden
- Volumen des Zentralen Kompartimentes (V_1) 8,46 (7,35) l/kg
- Verteilungsvolumen nach der Flächenmethode (V_d) 69,39 (86,54) Liter/kg
- Totale Clearance 85,36 (85,47) ml/min.

Abbildung 8 zeigt den zeitlichen Verlauf der kumulativen Ausscheidung der Radioaktivität in Urin und Stuhl. Auch diese Kurven stimmen nach beiden Verabreichungen überein. Innerhalb von 96 Stunden wurden in den Urin nur 15,3 ± 1,04 % (15,2 ± 0,92) in den Stuhl aber 75,5 ± 1,90 (76,9 ± 2,40) % der injizierten Radioaktivität ausgeschieden.

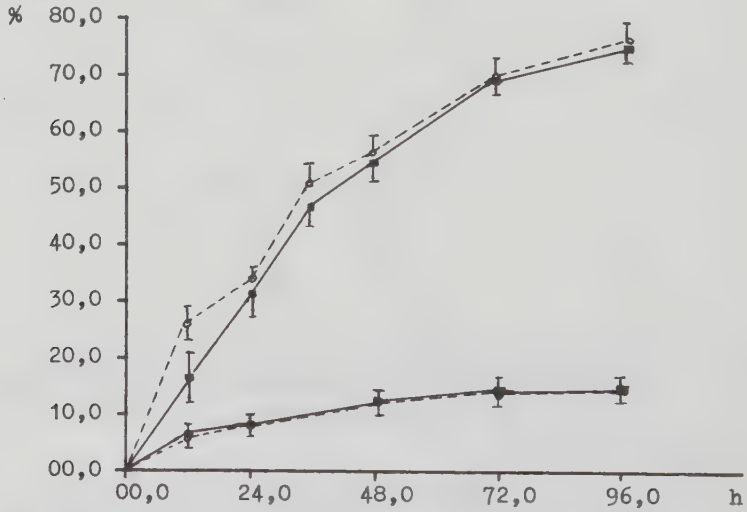


Abb. 8: Kumulative Ausscheidung der ^{3}H-Aktivität (in % der Dosis) in Urin (unten) und Stuhl (oben) nach i.v.-Gabe von ^{3}H-Digoxin. ——— = 1. Injektion (1. Tag), ----- = 2. Injektion (13. Tag). Mittelwerte (± SEM) von 6 weibl. und 2 männl. Kaninchen.

0,55 ± 0,12 % der ^{3}H-Aktivität im Urin konnten auf Tritiumwasser bezogen werden.

2. Stoffwechseluntersuchungen

96 Stunden nach der ersten ^{3}H-Digoxin-Dosis betrug die kumulative chloroformextrahierbare Urinfraktion 3,1 ± 0,1 % der injizierten Radioaktivität, was etwa 22 % der gesamten Urinaktivität entsprach (Abb. 9). Nach enzymatischer Spaltung mit Glucuronidase-Sulfatase und saurer Hydrolyse wurden weitere 5,6 ± 0,3 % der applizierten Dosis in Chloroform überführt. (= 36 % der Urinaktivität) (Abb. 9).

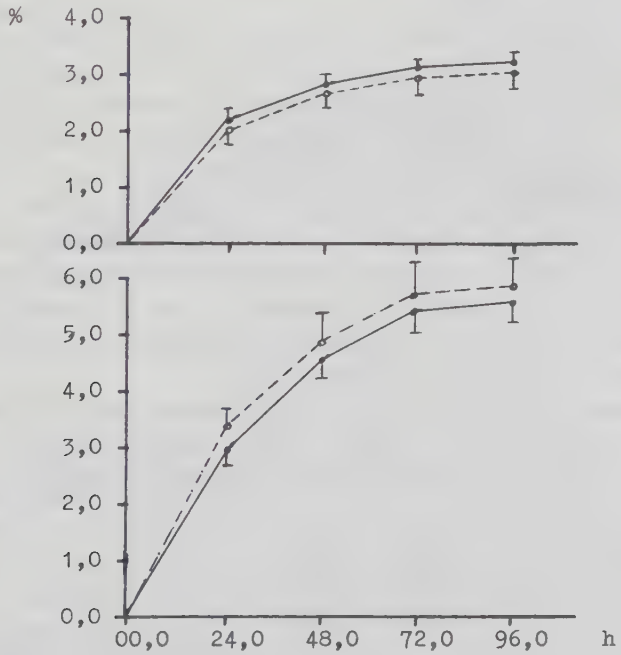


Abb. 9: Kumulative Ausscheidung (in % der Dosis) der in Chloroform extrahierbaren ^{3}H-Aktivität in den Urin nach i.v.-Gabe von ^{3}H-Digoxin. Oben: vor, unten: nach Inkubation mit Glucuronidase-Sulfatase und saurer Hydrolyse. ——— = 1. Injektion (1. Tag), ----- = 2. Injektion (13. Tag). Mittelwerte (± SEM) von fünf Kaninchen.

Nach der 2. Injektion von ^{3}H-Digoxin war die kumulative chloroformextrahierbare Urinfraktion vor der weiteren Aufarbeitung mit 3,0 ± 0,2 % der Dosis gering, jedoch nicht signifikant niedriger als nach der ersten Applikation. Nach der enzymatischen Spaltung und sauren Hydrolyse ließ sich ein mit 5,9 ± 0,5 % etwas größerer Anteil in Chloroform extrahieren als nach der ersten Dosis (5,6 ± 0,3 %) (Abb. 9). Wiederum waren die Unterschiede gegenüber den nach der ersten Gabe des markierten Glykosids erhobenen Werten nicht signifikant. Insgesamt ließen sich nach beiden Injektionen jeweils weniger als 60 % der in den Urin ausgeschiedenen Radioaktivität in Chloroform extrahieren.

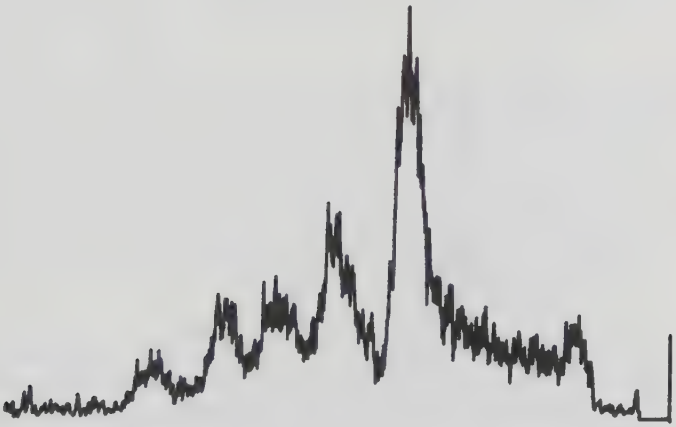
Es zeigte sich eine zeitliche Abhängigkeit der in Chloroform überführbaren Tritiumaktivität: In den ersten 24 Stunden wurden 24,6 ± 1,8 % der in dieser Urinportion enthaltenen ^{3}H-Aktivität, zu späteren Zeiten deutlich weniger extrahiert. In der Sammelperiode 72-96h betrug der Wert nur noch 9,9 ± 1,9 %. Entsprechend stieg der nach Inkubation mit Glucuronidase-Sulfatase extrahierbare Anteil in den betreffenden Zeiträumen von 15 ± 1,5 % auf 21 ± 1,8 %. Nach saurer Hydrolyse ließen sich weitere 20 % extrahieren, unabhängig vom Zeitpunkt des Urinsammelns. Nach der 2. Injektion zeigte sich im wesentlichen ein gleichförmiges Extraktionsverhalten.

Bei der dünnschichtchromatographischen Auswertung der extrahierten Urinaktivität fanden wir mehrere Peaks, die sich folgenden parallel laufenden Reinsubstanzen zuordnen ließen:

- Digoxin (D_3)
- Digoxigenin-bis-digitoxosid (D_2)
- Digoxigenin-mono-digitoxosid (D_1)
- Digoxigenin (D), Dihydrodigoxigenin (DH)

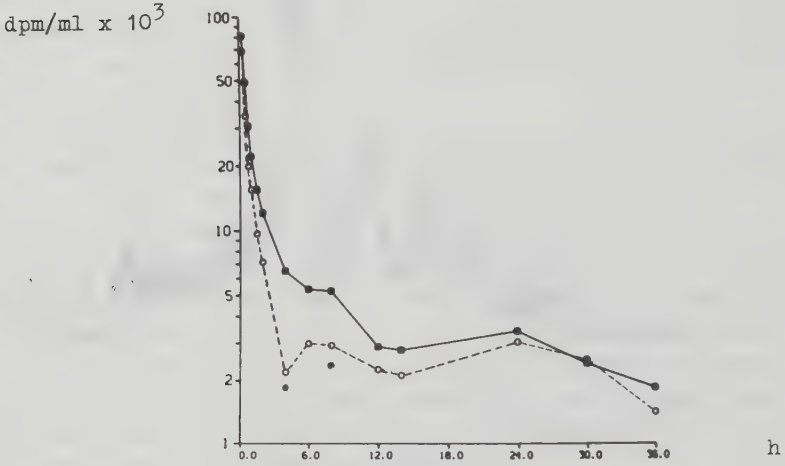
Eine radioaktive Bande (X) entsprach in ihrem Laufverhalten in den gewählten Lösungsmittelsystemen keiner der uns zur Verfügung stehenden Referenzsubstanzen (Abb. 10).

Abb. 10: Dünnschichtchromatogramm des Chloroformextraktes aus dem Urin. Das Chromatogramm stellt einen typischen Einzelversuch dar. Erklärung der Abkürzungen im Text (S. 24).



Bei der Aufarbeitung des Serums fanden sich in den ersten 2 Stunden nach der Gabe von ^{3}H-Digoxin 95 % der aufgetragenen Radioaktivität im Säuleneluat. Zu späteren Zeiten sank dieser Wert bis auf 50 % ab. 15 Minuten nach der ersten Injektion ließen sich 78,77 $\pm$ 2,73 % der Radioaktivität aus dem Serum extrahieren. Dieser in Chloroform überführbare Anteil wurde zeitabhängig geringer und betrug ab der 4. Stunde etwa 20-30 %. Nach der 2. Injektion wurde, besonders während der ersten 8 Stunden, weniger Radioaktivität in Chloroform übergeführt. Die Unterschiede waren für die Zeiten 0,75, 4 und 8 Stunden signifikant (Abb. 11).

Abb. 11: Chloroformextrahierbare Radioaktivität im Serum (in dpm/ml x 10^3) während der ersten 36 Stunden nach i.v.-Gabe von ^{3}H-Digoxin. ——— = 1. Injektion (1. Tag), ----- = 2. Injektion (13. Tag). Mittelwerte von 6 weibl. und 2 männl. Kaninchen. ✱ = signifikanter Unterschied.



Die dünnschichtchromatographische Auswertung der Chloroformextrakte des Serums ergab nur einen Peak, der sich Digoxin zuordnen ließ.

DISKUSSION

Tierversuche nehmen bei der Erforschung der Herzglykoside auch heute noch einen breiten Raum ein. In zahlreichen tierpharmakologischen Publikationen, die sich mit dem Stoffwechsel der Digitalisglykoside beschäftigten, wurden Metabolisierungswege beschrieben, die sich später auch beim Menschen nachweisen ließen (70, 72).
Unsere Untersuchungen wurden an Kaninchen vorgenommen, weil bisher nur wenige Befunde über den Stoffwechsel der Herzglykoside bei diesem Versuchstier vorlagen. Die Erarbeitung pharmakokinetischer Grundlagen schien bei diesem Tier auch deshalb notwendig, weil vorausgegangene Studien von Louven an unserer Klinik nur geringe Wirkungen von großen Digitalisdosen auf die experimentelle Herzkontusion nachweisen ließen (57).
Eine Voraussetzung für unsere Untersuchungen war die Verfügbarkeit ^{3}H-markierter Glykoside hoher spezifischer Aktivität, deren Reinheit dünnschichtchromatographisch untersucht wurde. Die radioaktive Markierung des komplizierten Moleküls war auch hinreichend stabil, so daß die von uns gemessene Aktivität nicht etwa auf durch Austausch oder Metabolismus entstandenes Tritiumwasser sondern tatsächlich auf die Glykoside und ihre Metabolite bezogen werden mußte. Bei unseren Versuchen konnten im Urin nur 0,55 $\pm$ 0,12 %, im Serum 0,99 $\pm$ 0,9 % der Tritiumaktivität als ^{3}H-Wasser nachgewiesen werden.
Die gewählte tägliche Dosis von meist 0,2 mg Digoxin pro kg Körpergewicht beim Kaninchen beträgt etwa das 35-fache der des Menschen. Daß wir uns dabei nicht im toxischen Bereich bewegten, geht aus einer Arbeit von Schmidt und Butler (79) hervor, die zeigten, daß Dosen unter 0,45 mg/kg intravenös verabfolgt beim Kaninchen keine Intoxikation hervorrufen. Dies konnten sie erst bei Dosen von 0,5 mg/kg und mehr nachweisen. Bereits Hatcher (37) sowie Herrmann et al. (38, 39, 40) hatten große Speziesunterschiede in der Glykosidempfindlichkeit beob-

achtet. Wie aus Untersuchungen von Kaihara und Leand (48) hervorgeht, scheint der Mensch empfindlicher zu sein als die Katze und die wiederum empfindlicher als der Hund, das Kaninchen und die Ratte. Russell und Klaassen (78) versuchten, dieses unterschiedliche Verhalten durch Vergleich der LD_{50} an verschiedenen Tierspezies zu quantifizieren, und fanden dabei, daß Ratten etwa um den Faktor 25 weniger empfindlich gegen Digoxin sind als Kaninchen; Hunde waren 92mal empfindlicher als Ratten. Verschiedene Mechanismen dürften als Ursache dieses Phänomens von Bedeutung sein. Die unterschiedliche Bindung von Digitalisglykosiden an bestimmte Teile von Herzmuskelzellen (48, 49) steht dabei in Zusammenhang mit einer nicht einheitlich starken Hemmung der Na^+-K^+-aktivierten Membran-ATPase des Herzmuskels (71, 73). Zusätzlich spielen voneinander verschiedene Eliminationsmechanismen für das Glykosid eine Rolle (67, 78).

Zum Verständnis der Versuchsergebnisse seien einige Bemerkungen über die von uns verwendeten pharmakokinetischen Begriffe vorangestellt (23, 31, 56, 97, 98).
Pharmakokinetik ist eine wissenschaftliche Disziplin, die das Schicksal eines Pharmakon im Organismus quantitativ zu erfassen sucht. Es werden dabei mathematische Funktionen und Konstanten bestimmt, die das Zeitverhalten der biologischen Prozesse um das Pharmakon beschreiben, darüber hinaus Vorausberechnungen über eben dieses Zeitverhalten des Pharmakons oder seiner Metaboliten ermöglichen und die Vorgänge und Einflüsse, denen ein Medikament unterliegt, verständlicher machen.
Eine wichtige Voraussetzung für pharmakokinetische Beschreibungen eines Prozesses ist die Betrachtung des Körpers als ein System von Kompartimenten, also von Verteilungsräumen für das applizierte Pharmakon. Man muß sich aber vor Augen halten, daß diese Kompartimente keine physiologische oder anatomische Realität haben. Es handelt sich vielmehr um fiktive Größen. Bei der Berechnung ergeben sich zum Teil Verteilungsräume, die ein Vielfaches des Körpervolumens betragen. Dies ist ein jedoch nur scheinbarer Widerspruch, der sich dadurch erklärt, daß in

solchen Fällen das Pharmakon in bestimmten Strukturen oder Geweben angereichert wird. Diese modellhafte Aufteilung des gesamten Verteilungsraumes eines Medikamentes in verschiedene Kompartimente führt zu den unterschiedlichen Ein-, Zwei-, Drei- und Mehr-Kompartment-Modellen, von denen wir im folgenden die drei am häufigsten gebrauchten etwas genauer besprechen wollen. Vorher sei noch auf eine Besonderheit vieler pharmakokinetischer Prozesse hingewiesen, die darin besteht, daß diese sich durch eine Kinetik erster Ordnung beschreiben lassen. Dies bedeutet zum Beispiel, daß die zeitliche Änderung einer Pharmakonkonzentration in einem beliebigen Kompartiment zu einer bestimmten Zeit eben dieser Konzentration zu derselben Zeit proportional ist. Dies trifft nicht für alle pharmakokinetischen Prozesse zu, es sei nur an die begrenzte Leistungskapazität von Enzymsystemen erinnert.

Ein-Kompartment-Modell:

Beim Ein-Kompartment-Modell wird der Körper als eine einzige homogene Einheit betrachtet. Das Blockdiagramm in Abb. 12 illustriert dieses einfachste Modell, das zur Beschreibung von Plasmaspiegelkurven und Urinausscheidungsverhalten solcher Medikamente angewandt wird, die sich sehr schnell im Körper verteilen. Wenn die Elimination der Substanz einer Kinetik 1. Ordnung entspricht, ergibt sich nach rascher intravenöser Injektion bei halblogarithmischer Auftragung von Plasmaspiegel (C(t)) gegen die Zeit (t) eine Gerade (Abb. 12). Mathematisch läßt sich eine solche Kinetik 1. Ordnung ausdrücken als:

$$\frac{-dC(t)}{dt} = k\, C(t)$$

Durch Integration ergibt sich daraus

$$C(t) = C_o e^{-kt} \qquad (5)$$

mit k = Konstante und C_o = Plasmakonzentration zur Zeit t = o. (Dabei ist der Idealfall einer sofortigen, vollständigen Verteilung des Medikamentes nach der i.v.-Injektion angenommen.)

C_o erhält man durch Rückextrapolation der Geraden nach t = o. Durch Logarithmieren entsteht aus Gleichung (5)

$$\ln C(t) = \ln C_o - kt \qquad \text{(Abb. 12).}$$

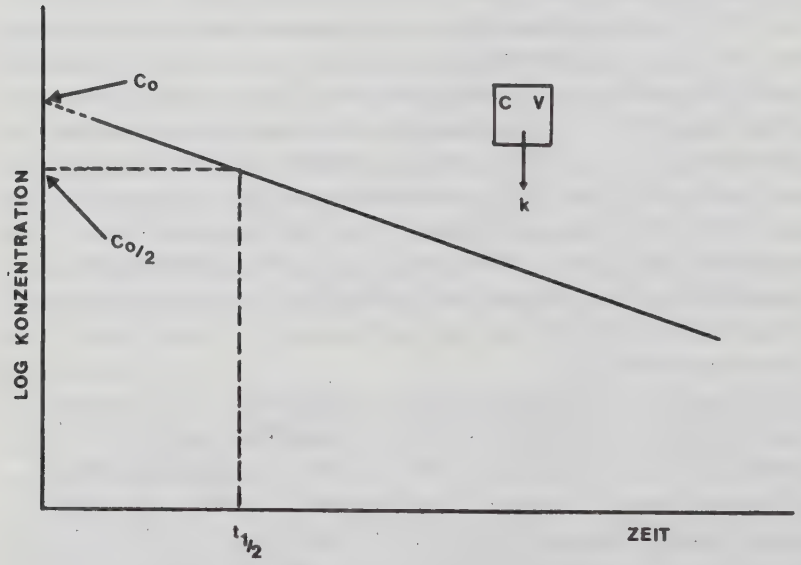


Abb. 12: Ein-Kompartment-Modell (bei rascher intravenöser Injektion). Erklärung der Abkürzungen im Text (S. 29 - 31).

Die Steigung k der Geraden wird auch als Eliminationskonstante bezeichnet. Die Eliminationshalbwertzeit $t_{1/2}$ ist als jene Zeit definiert, in der die Konzentration C(t) zu einer beliebigen Zeit auf die Hälfte des betreffenden Wertes abgesunken ist. Wendet man dies auf t = 0 an, so ergibt sich (Abb. 12)

$$C_o/2 = C_o e^{-kt_{1/2}} \text{ oder } \ln 2 = kt_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \ln 2/k \qquad (6)$$

Das Verteilungsvolumen V errechnet sich beim Ein-Kompartment-Modell aus der Gleichung

$$V = \text{i.v.-Dosis}/C_o$$

Eine andere Möglichkeit, das Verteilungsvolumen zu bestimmen, ist die von Dost (23) beschriebene Flächenmethode. Dabei errechnet sich das Verteilungsvolumen aus der Beziehung

$$V = \text{i.v.-Dosis}/\text{Fläche} \times k$$

Fläche bedeutet dabei das Integral der Plasmakonzentration über die Zeit, also die Gesamtfläche unter der Plasmakonzentrationszeitkurve. Diese Flächenmethode hat den Vorteil, daß man sie nicht nur bei intravenöser, sondern auch bei oraler oder jeder anderen Applikationsform anwenden kann. Statt der i.v.-Dosis steht dann die jeweilige, tatsächlich das Plasmavolumen erreichende Arzneimittelmenge im Zähler. Darüberhinaus ist diese Methode bei einigen linearen Mehr-Kompartment-Modellen anwendbar. Da das nach der Flächenmethode errechnete Verteilungsvolumen sämtliche Kompartimente berücksichtigt, ist es fast immer größer als das zentrale Verteilungsvolumen.
Die oben genannte Eliminationskonstante k sagt aus, wieviel von der im Verteilungsvolumen vorhandenen Substanz pro Zeiteinheit eliminiert wird. Sie steht (Gleichung (6)) in umgekehrt proportionalem Verhältnis zur Halbwertzeit. Das Produkt k x V bezeichnet jenes virtuelle Volumen, welches pro Zeiteinheit von der betreffenden Substanzmenge "geklärt" wird. Dies ist der Begriff der totalen Clearance, die alle Eliminationsvorgänge in ihrer Gesamtheit erfaßt. Bei den Stoffen, die ausschließlich über ein Organ ausgeschieden werden, ist die totale Clearance mit der Organclearance identisch. Im Beispiel der Niere reduziert sich der Begriff dann auf die vertraute Bezeichnung der renalen Clearance.
Erwähnt sei noch die Berechnung von Arzneimittelkonzentrationen bei wiederholter Applikation. Dost (23) errechnete für den Fall, daß eine bestimmte intravenöse Dosis eines Pharmakon

in konstanten Zeitintervallen (τ) wiederholt zugeführt wird, folgende Funktion, die den Konzentrationsverlauf im Plasma beschreibt

$$C(t) = \frac{\text{i.v.-Dosis } (1 - e^{-nk\tau})}{V\ (1 - e^{-k\tau})} \times e^{-kt} \qquad (7).$$

Dabei bedeuten n die Anzahl der applizierten Dosen und t die Zeit nach der Applikation der letzten Dosis. Obige Funktion erlaubt es, Plasmaspiegel im voraus zu berechnen. In abgewandelter Form gilt sie auch für Mehr-Kompartment-Systeme.

Mehr-Kompartment-Modelle:

Die Kinetik von nur wenigen Substanzen läßt sich mit einem Ein-Kompartment-Modell berechnen. In den meisten Fällen benötigt das verabreichte Medikament einige Zeit, bis es sich im Körper verteilt hat. Während dieser Verteilungsphase werden die Plasmakonzentrationen schneller absinken als zu den späteren Zeiten. Ob diese Verteilungsphase erkannt wird, hängt sowohl von den Zeitabständen, an denen die Blutentnahmen erfolgen, als auch von der Dauer der Verteilungsphase ab. Bei schneller intravenöser Injektion eines Medikamentes lassen sich in einem solchen Fall die Plasmakonzentrationszeitkurven durch die Summe von 2, 3 oder mehr Exponentialfunktionen beschreiben. Bei halblogarithmischer Auftragung der Plasmakonzentrationen ($C_1(t)$) gegen die Zeit (t) entspricht dies einer Aufteilung der Kurven in 2, 3 oder mehr lineare Komponenten (Abb. 13 u. 14). Die Gleichungen (8) und (9) beschreiben die Kurven in den Abbildungen 13 und 14:

$$C_1(t) = A_1 e^{-\gamma_1 t} + A_2 e^{-\gamma_2 t} \qquad (8)$$

$$C_1(t) = A_1 e^{-\gamma_1 t} + A_2 e^{-\gamma_2 t} + A_3 e^{-\gamma_3 t} \qquad (9).$$

Dabei bedeuten die Koeffizienten $A_{1,2,3}$ die Schnittpunkte der Geraden mit der Ordinatenachse, die Exponenten $\gamma_{1,2,3}$ die Steigungen dieser Geraden (Abb. 13 u. 14).

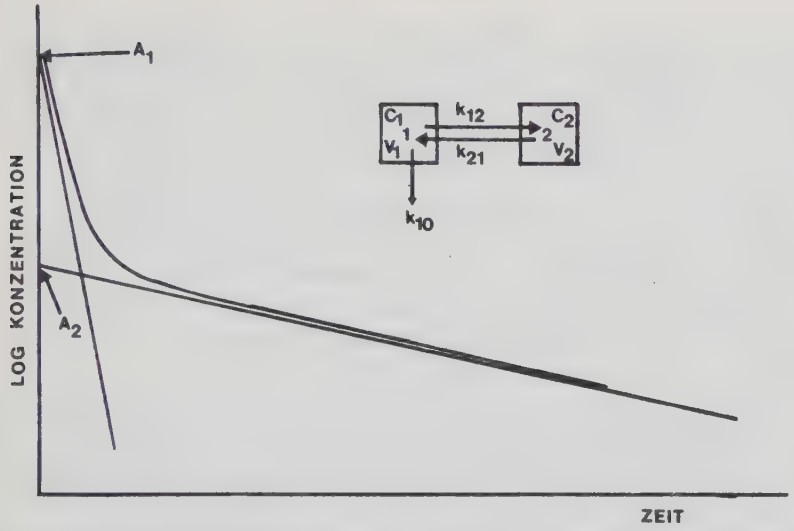


Abb. 13: Zwei-Kompartment-Modell (bei rascher intravenöser Injektion). Erklärung der Abkürzungen im Text (S. 32 - 36).

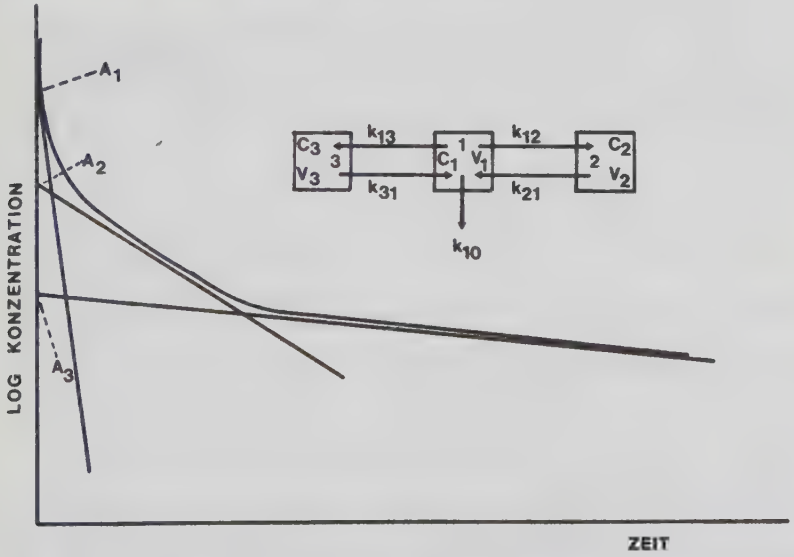


Abb. 14: Drei-Kompartment-Modell (bei rascher intravenöser Injektion). Erklärung der Abkürzungen im Text (S. 32 - 36).

Diese phänomenologische Beschreibung der Blutspiegelkurven hat primär nichts mit Modellen zu tun, sondern sie liefert die von einem Modell unabhängigen Eigenwerte $\gamma_{1,2,3}$ und Eigenvektoren $A_{1,2,3}$ des zugrunde liegenden Systems von Differentialgleichungen und gestattet eine Statistik dieser Konstanten. Gibt man sich mit der Kurvenbeschreibung nicht zufrieden, kann mittels der errechneten Koeffizienten und Exponenten ein pharmakokinetisches Modell erstellt werden, das eine Deutung der Konzentrationsverhältnisse zuläßt. Die Anzahl der Terme spiegelt dabei die Anzahl der Kompartimente wider. Jede Modellbildung muß so erfolgen, daß die Eigenwerte der das Modell beschreibenden kinetischen Matrix mit den phänomenologisch durch Regression bestimmten Eigenwerten übereinstimmen.
Abb. 13 und 14 zeigen ebenfalls die zu den betreffenden Modellen gehörenden Blockdiagramme. Man erkennt, daß neben dem zentralen Kompartiment 1, welches meistens auch das Plasmavolumen einschließt, weitere periphere Kompartimente oder "Gewebe"-Kompartimente 2, 3 bestehen.
Ersetzt man die Koeffizienten $A_{1,2}$ und Exponenten $\gamma_{1,2}$ durch die jeweiligen im Blockdiagramm der Abb. 13 eingezeichneten Gleichgewichts- und Eliminationskonstanten, so lautet im Falle des offenen, linearen Zwei-Kompartment-Modells (29, 35, 52, 98) Gleichung (8):

$$C_1(t) = \frac{\text{i.v.-Dosis}}{V_1}\left[\frac{(k_{21}-\alpha)}{(\beta-\alpha)}\,e^{-\alpha t} + \frac{(k_{21}-\beta)}{(\alpha-\beta)}\,e^{-\beta t}\right] \qquad (10)$$

mit $\alpha = 1/2\left[(k_{12}+k_{21}+k_{10}) + ((k_{12}+k_{21}+k_{10})^2-4k_{21}k_{10})^{1/2}\right]$

und $\beta = 1/2\left[(k_{12}+k_{21}+k_{10}) - ((k_{12}+k_{21}+k_{10})^2-4k_{21}k_{10})^{1/2}\right]$

Dabei bedeuten $C_1(t)$ die Konzentration des betreffenden Medikamentes im zentralen Kompartiment und V_1 das Volumen dieses Kompartimentes (Abb. 13).
Für den Fall eines offenen, linearen Drei-Kompartment-Modells (29, 98) mit Elimination aus dem zentralen Kompartiment, wie es

im Blockdiagramm der Abb. 14 dargestellt ist, wurde nach Benet (5) folgende Gleichung hergeleitet, die die Arzneimittelkonzentration im zentralen Kompartiment ($C_1(t)$) nach einer intravenösen Bolusinjektion (52) beschreibt; (vergleiche mit Gleichung (9)):

$$C_1(t) = \frac{\text{i.v.Dos.}}{V_1}\left[\frac{(k_{21}-\alpha)\,(k_{31}-\alpha)}{(\beta-\alpha)\,(\gamma-\alpha)}\,e^{-\alpha t} + \frac{(k_{21}-\beta)\,(k_{31}-\beta)}{(\alpha-\beta)\,(\gamma-\beta)}\,e^{-\beta t} + \frac{(k_{21}-\gamma)\,(k_{31}-\gamma)}{(\alpha-\gamma)\,(\beta-\gamma)}\,e^{-\gamma t}\right] \qquad (11)$$

α, β und γ sind dabei komplizierte Funktionen der übrigen Konstanten. Umgekehrt lassen sich auch die Eliminations- und Gleichgewichtskonstanten aus den jeweiligen Koeffizienten und Exponenten der Gleichungen (8) und (9) errechnen (60, 97, 98).

Ein derart erstelltes Modell erlaubt es , die Arzneimittelmenge in jedem einzelnen Kompartiment und die Fließgeschwindigkeit anzugeben (62), sowie Konzentrationsabläufe über die Zeit in den Räumen zu berechnen, in denen man den biologisch relevanten Rezeptor vermutet, obwohl nur das zentrale Kompartiment der Messung zugänglich ist.

Für das Zwei- und Drei-Kompartment-Modell wurden Formeln hergeleitet, aus denen man die Verteilungsvolumina, die totale Clearance sowie die Plasmakonzentrationen nach wiederholter Applikation errechnen kann (27, 28, 29, 97, 98).

Schließlich sei darauf hingewiesen, daß für die späten Zeiten die ersten Glieder der Gleichungen (8) und (9) zu vernachlässigen sind, so daß die Plasmakonzentration sich dann durch

$$C_1(t) = A_3 e^{-\gamma_3 t} \qquad (12)$$

beschreiben läßt. Der Exponent γ_3 wird in der Literatur in diesem Zusammenhang oft als ß-slope bezeichnet (27, 74, 97) und hat dann die Bedeutung einer "eigentlichen" Eliminations-

konstanten, die daraus nach Gleichung (6) abgeleitete Halbwertzeit $t_{1/2\gamma_3}$ die einer "maßgeblichen" Halbwertzeit (predominant half life time).

In unseren Versuchen wurden die zeitabhängigen Meßwerte im Serum durch nicht-lineare Regression approximiert. Zur Annäherung erwies sich dabei eine Exponentialsumme aus drei Termen von der Form der Gleichung (9) am geeignetsten, die eindeutig und ohne Verlust von Informationen den Verlauf der Blutspiegelkurven beschreibt:

$$C_1(t) = A_1 e^{-\gamma_1 t} + A_2 e^{-\gamma_2 t} + A_3 e^{-\gamma_3 t} \qquad (13)$$

Die gewonnenen Daten erwiesen sich mit einem offenen linearen Drei-Kompartment-Modell nach schneller intravenöser Injektion vereinbar, wie es im Blockdiagramm der Abb. 14 dargestellt ist. Dies galt sowohl für das radioaktiv markierte Glykosid als auch für das nicht markierte (siehe auch Abb. 4, 6, 7). Dieses Modell ist weder mathematisch noch physiologisch exakt, sondern stellt eine Vereinfachung der physiologischen Prozesse dar, denen das Medikament bei Verteilung und Elimination im Organismus unterworfen ist. In unserem Fall stimmte das Drei-Kompartment-Modell mit den Meßdaten besser überein als das übliche Zwei-Kompartment-Modell. Über triexponentielle Kinetiken nach intravenöser Gabe von Digoxin wurde auch in Studien beim Menschen berichtet (20, 52, 93). Da das Kaninchen Digoxin ausgiebig metabolisiert (s.u.), ist die Annahme eines Modelles, zumindest für den Versuch mit ^{3}H-Digoxin, natürlich nur mit großen Einschränkungen möglich. Wir begnügen uns daher mit der Deutung einzelner, aus diesem Modell errechneter pharmakokinetischer Parameter sowie dem Vergleich dieser mit entsprechenden Werten beim Menschen und anderen Spezies.
Die pharmakokinetischen Parameter der ^{3}H-Aktivitäten (Tab. 3) unterscheiden sich deutlich von denen der radioimmunologisch erfaßbaren Substanzen (Tab. 1). Die Differenz erklärt sich einmal aus der Tatsache, daß der Radioimmunoassay nicht alle Stoffwechselprodukte von Digoxin erfaßt. Er erlaubt zwar keine

Differenzierung zwischen Digoxin und jenen Metaboliten, die das intakte Genin in ihrer Struktur enthalten, d. h. Digoxigenin, Digoxigenin-bis-digitoxosid und Digoxigenin-mono-digitoxosid, er erfaßt aber nicht die Stoffwechselprodukte, die Veränderungen des Geninanteils aufweisen (54, 87). Eine weitere Erklärung könnte in den in beiden Untersuchungen zeitlich unterschiedlichen Blutentnahmen zu suchen sein: Nach der Injektion von ^{3}H-Digoxin wurden über einen viel längeren Zeitraum (96h) Blutproben entnommen als nach der Applikation des nicht markierten Glykosids (25h), denn durch die begrenzte Empfindlichkeit war es mit dem Radioimmunoassay nicht möglich, länger als 25 Stunden nach der Applikation Plasmakonzentrationen zu analysieren. Der Zeitraum der Probenentnahmen kann jedoch die pharmakokinetischen Ergebnisse stark beeinflussen (28).

Die Halbwertzeiten $t_{1/2\gamma_1}$ der schnellen γ_1-Phasen stimmen mit 0,25 $\pm$ 0,05 und 0,18 $\pm$ 0,02 Stunden bei beiden Versuchsansätzen überein (Tab. 1 u. 3). Kurz nach der Injektion würde man ja auch keine nennenswerte Metabolisierung erwarten, so daß die Plasmakonzentrationszeitkurve wahrscheinlich im wesentlichen durch Verteilungsvorgänge beeinflußt ist. Auch die nach 30 Minuten gemessenen Plasmaspiegel von etwa 45 ng/ml (Radioimmunoassay) und 60 - 100 ng/ml (Totalaktivität) entsprechen sich in etwa.

Die totale Clearance beträgt für das "kalte" Glykosid 142,4 $\pm$ 14,12 und für markiertes Digoxin 85,36 $\pm$ 4,22 ml/min. Daraus läßt sich bereits schließen, daß Digoxin beim Kaninchen zu solchen Stoffwechselprodukten metabolisiert wird, die nur verzögert eliminiert werden können.

Alle übrigen von uns errechneten kinetischen Parameter (Halbwertzeiten der γ_2- und γ_3-Phasen, Volumen des zentralen Kompartimentes und Verteilungsvolumen nach der Flächenmethode) sind für die Radioaktivitäten immer größer als für die radioimmunologisch erfaßten Kurven (Tab. 3 u. 1).

Die maßgebliche Halbwertzeit $t_{1/2\gamma_3}$ radioimmunologisch be-

stimmten Digoxins dauert in unserer Arbeit 14 Stunden, die der gesamten Radioaktivität dagegen annähernd 35 Stunden. Schmidt et al. (80) errechneten in ihrer Studie mit markiertem Digoxin an Kaninchen eine Eliminationshalbwertzeit der totalen Radioaktivität von etwa 3,4 Tagen. Der Unterschied zu diesen Ergebnissen ist möglicherweise dadurch verursacht, daß wir im Gegensatz zu ihnen spezifisch markiertes Digoxin verwandten und die Blutproben nur 96 Stunden aufarbeiteten.
Die nach der Flächenmethode errechneten Verteilungsvolumina (51 bzw. 70 Liter/kg) sind um ein Vielfaches größer als das Körpergewicht (Tab. 1 u. 3). Das Fassungsvermögen der Gewebe für Digoxin scheint also beim Kaninchen sehr viel größer zu sein als beim Menschen, für den Verteilungsvolumina in der Größenordnung von 5 - 8 Liter/kg errechnet wurden (17, 18, 51, 52, 63). Die großen Verteilungsräume weisen auf eine Anreicherung des Digoxins in Geweben hin. Ähnliche Beobachtungen wurden von Doherty (21) bei Hunden gemacht, die Anreicherungen im Gewebe um das 40fache der Plasmakonzentrationen aufwiesen.

15 % der injizierten Radioaktivität wurden innerhalb von 96 Stunden nach der Injektion im Urin gefunden (Abb. 8), und nur ein kleiner Teil (22 %) davon in Chloroform extrahiert. Auch nach enzymatischer Spaltung und saurer Hydrolyse ließ sich lediglich ein geringer Prozentsatz (36 %) in das organische Lösungsmittel überführen (s.o.). Diese Ergebnisse zeigen, daß im Gegensatz zu Ratte (67), Meerschweinchen (67), Hund (36) und Mensch (34) die renale Clearance unveränderten Digoxins beim Kaninchen nur sehr wenig zur totalen Clearance des Medikamentes beiträgt. Die Befunde stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Lauterbach (55), der fand, daß Kaninchen Herzglykoside und ihre Metabolite, allerdings nach oraler Administration, vorwiegend renal ausscheiden.
Etwa 75 % der verabreichten Radioaktivität waren nach 96 Stunden im Stuhl (Abb. 8). Sowohl vor als auch nach enzymatischer Spaltung und saurer Hydrolyse konnte bei 3 Tieren keinerlei Radioaktivität aus dem Stuhl in Chloroform extrahiert werden (64).

Das Kaninchen scheidet also intravenös verabreichtes Digoxin vorwiegend fäkal aus. Es ist zu vermuten, daß die Radioaktivität wohl vor allem über die Galle in den Darm gelangt. Dies geht aus Arbeiten von Russell und Klaassen (76, 77, 78) hervor, die bereits nach 12 Stunden 60 % des intravenös verabreichten Digoxins in der Galle des Kaninchens fanden.
Da insgesamt nur ein geringer Anteil der in Urin und Stuhl ausgeschiedenen Aktivität in Chloroform zu extrahieren war (s.o.), dürfen wir annehmen, daß das Kaninchen Digoxin vorwiegend in Form seiner Metabolite ausscheidet. Es verhält sich somit grundsätzlich anders als der Mensch, der Digoxin nur in einem geringen Ausmaß metabolisiert (19, 58, 102). Die Abnahme der von der Säule eluierbaren Serumaktivität von 95 % in den ersten Stunden auf 50 % zu späteren Zeiten dürfte Ausdruck einer zunehmenden Metabolisierung sein. Diese Annahme findet zusätzlich darin ihre Bestätigung, daß die Chloroformextrahierbarkeit des Serums während des gleichen Zeitraumes von etwa 80 % auf 20 % absank. Das oben bereits dargestellte Extraktionsverhalten der Urinaktivität liefert eine weitere Bestätigung: Dem von 25 % während der ersten 24 Stunden auf 10 % während der Sammelperiode 72-96h absinkenden chloroformextrahierbaren Anteil der Urinaktivität steht der zu den gleichen Zeiträumen von 15 % auf 21 % steigende Anteil gegenüber, der sich nach Inkubation mit Glucuronidase-Sulfatase extrahieren ließ. Dies läßt sich als zunehmende Glucuronierung bei gleichzeitiger Abnahme des unveränderten Digoxins interpretieren.
Unsere Ergebnisse lassen keinen eindeutigen Schluß auf den Metabolisierungsort zu:
Der Niere des Versuchstieres ist wahrscheinlich in Bezug auf den Digoxinstoffwechsel keine größere Bedeutung zuzumessen, denn Tschoepe (95) konnte in der isoliert perfundierten Kaninchenniere keine Metabolite nachweisen.
Wir können auch nicht ausschließen, daß das Digoxin erst im Darm, etwa durch die Darmflora, abgebaut wird. Das Extraktionsverhalten im Serum widerspricht jedoch dieser Annahme.

Lage und Spratt (53) fanden bei Inkubationsversuchen mit ^{3}H-Digoxin an Leberschnitten von Kaninchen, daß ein hoher Prozentsatz des zugegebenen Glykosids nach kurzer Zeit metabolisiert war, und schlossen daraus, daß die Leber für den raschen Abbau von Digoxin verantwortlich sei. Diese Annahme dürfte auch unseren Ergebnissen am ehesten entsprechen, da sie mit dem dargestellten Exkretions- und Extraktionsverhalten in Serum, Urin und Stuhl am besten zu vereinbaren ist.
In diesen Versuchen (53) wurden neben Digoxigenin, Digoxigenin-mono-digitoxosid und Digoxigenin-bis-digitoxosid auch ein großer Teil nicht identifizierbarer Metabolite gefunden. Möglicherweise entsprechen diese Metabolite den von uns nachgewiesenen Abbauprodukten, die sich dünnschichtchromatographisch zwischen Digoxigenin-bis-digitoxosid und Digoxigenin-mono-digitoxosid darstellten und nicht weiter identifiziert werden konnten (Abb. 10). Allerdings muß dazu bemerkt werden, daß die oft geübte Zuordnung zu parallel laufenden Substanzen zur Identifizierung der zahlreichen Metabolite nicht ausreicht. Aufwendigere Untersuchungen, wie etwa die Massenspektrometrie, müssen hier weitere Auskunft geben.

Das Exponentialgesetz der Elimination bringt es mit sich, daß die Konzentration einer in den Organismus aufgenommenen Substanz im Blut zwar eine vorgegebene Minimalgrenze nach einer endlichen, berechenbaren Zeit unterschreitet, daß sie aber theoretisch niemals bzw. erst nach unendlich langer Zeit Null erreicht. Wiederholte Zufuhren von konstanten Dosen eines Medikamentes in bestimmten Zeitintervallen führen solange zu einer Zunahme des Körperbestandes, bis ein Gleichgewichtszustand zwischen Zufuhr und Elimination des Arzneimittels erreicht ist. Das relative Ausmaß einer solchen Kumulation ist abhängig vom Verhältnis des Dosierungsintervalles zur Eliminationshalbwertzeit. Bei repetitiver Verabreichung werden bereits nach einem Zeitraum von 6 Halbwertzeiten mehr als 95 % des unter den Bedingungen einer Dauerbehandlung beobachteten Körperbestandes erreicht. Allerdings gelten diese Berechnungen

nur unter der Voraussetzung, daß die Clearance eines Arzneimittels sich unter der chronischen Zufuhr nicht verändert. In unserer Studie berechneten wir die Plasmaspiegel, die bei wiederholter täglicher Applikation jeweils 12 und 24 Stunden nach jeder Gabe zu erwarten waren. Man erkennt aus Tabelle 2, daß die vorausberechneten Blutspiegel nicht erzielt wurden. Statt dessen fielen die Konzentrationen des radioimmunologisch bestimmten Digoxins (Abb. 5) kontinuierlich ab und lagen am siebten Tag 12 Stunden nach der Injektion mit 0,23 $\pm$ 0,09 ng/ml signifikant niedriger als die vorausberechneten Werte mit 0,7 ng/ml. ($p < 0{,}005$). Die 24h-Werte lagen ebenfalls erheblich unter den errechneten Konzentrationen, die Nachweisgrenze des Radioimmunoassays liegt jedoch bei 0,1 ng/ml, so daß in vielen Seren eine Bestimmung nicht möglich war und deshalb definitive Aussagen nicht gemacht werden können.

Dieses Verhalten, das man bei Prozessen findet, in denen die Clearance einer Substanz gesteigert wird, versuchten wir mit markiertem Digoxin weiter abzuklären. Dabei wollten wir prüfen, ob sich nach wiederholter Zufuhr von Digoxin Änderungen in der Pharmakokinetik oder dem Extraktionsverhalten des markierten Glykosids zeigten. Eine Voraussetzung für einen solchen Vergleich war die Konstanz der biologischen Verhältnisse und der Versuchsbedingungen während der gesamten Versuchsdauer. Diese war gewährleistet insofern, als beide Injektionen an den gleichen Tieren vorgenommen wurden, deren Gewicht in etwa konstant blieb. Die Radioaktivität im Serum und im Urin war unmittelbar vor der zweiten Injektion so niedrig, daß nicht mit einer Verfälschung der Meßergebnisse gerechnet werden mußte.

Aus den Tabellen 3 und 4 geht hervor, daß die Kinetik der Gesamtradioaktivität im Serum durch die wiederholte Applikation des Medikamentes nicht beeinflußt wurde. Auch die Urin- und Stuhlausscheidung (Abb. 8) waren unverändert. Dies ist insofern nicht überraschend, da die Gesamtaktivität sowohl Digoxin als auch alle anfallenden Stoffwechselprodukte repräsen-

tiert, während der Radioimmunoassay nur die das Digoxigenin enthaltenden Metabolite erfaßt (54, 87). Das Extraktionsverhalten der Serum- und Urinaktivität in Chloroform wurde nur geringgradig nach chronischer Digoxinzufuhr verändert (Abb. 9 u. 11). Es ließ sich zwar eine leichte Verschiebung von chloroformextrahierbaren Substanzen zu wasserlöslichen, konjugierten Metaboliten erkennen, die Unterschiede waren jedoch klein und erreichten im allgemeinen keine Signifikanz. Darüberhinaus lassen sich einige Metabolite, wie z. B. das Reduktionsprodukt Dihydrodigoxin, in Chloroform zwar extrahieren, reagieren jedoch nicht mit den im Radioimmunoassay verwendeten Antikörpern.

Ein Meßfehler erscheint uns als Erklärung dafür, daß die radioimmunologisch bestimmten Plasmakonzentrationen nach mehrtägiger Zufuhr unter den vorausberechneten Werten lagen, deshalb ausgeschlossen, weil wir nicht nur alle Werte doppelt bestimmten, sondern auch in mehreren Versuchen zu den gleichen Ergebnissen kamen. Außerdem lag die Fehlerbreite des Radioimmunoassays in diesem Meßbereich mit $\pm$ 0,1 ng/ml deutlich niedriger als die Differenz zwischen den gemessenen und errechneten Werten.

Möglich wäre allerdings eine Änderung des Verteilungsraumes unter der mehrtägigen Behandlung. Durch die positiv inotrope Wirkung der Digitalisglykoside wären Volumenverschiebungen zwischen Intra- und Extrazellulärraum mit einer solchen sekundären Veränderung des Verteilungsvolumens durchaus möglich, scheinen aber unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen unwahrscheinlich, da die Tiere keine Zeichen einer Herzinsuffizienz aufwiesen und ja auch Veränderungen in der Kinetik des markierten Glykosids nicht festzustellen waren.

Auch eine gesteigerte renale oder biliäre Elimination kann bei der unveränderten ^{3}H-Kinetik keine große Rolle spielen.

Wahrscheinlicher scheint eine Induktion des Stoffwechsels durch die chronische Applikation von Digoxin selbst. Die möglicherweise entstehenden Stoffwechselprodukte müssen nicht radio-

immunologisch erfaßbar sein. Wenn auch der letzte Beweis für diese Annahme noch aussteht, erfährt sie doch durch die Tendenz einer Änderung des Extraktionsverhaltens nach der wiederholten Digoxingabe eine weitere Absicherung.
In der Literatur wurde an zahlreichen Versuchstieren eine Induktion des Glykosidstoffwechsels durch z. B. Barbiturate, Steroide und Spironolacton beschrieben (1, 11, 12, 13, 61, 83, 84, 91, 92, 103), sowie über eine Steigerung des Stoffwechsels von Medikamenten nach chronischer Verabreichung berichtet (14, 15, 16, 26, 68, 69), jedoch lagen die dafür erforderlichen Dosen meist im Grammbereich. Die vorgelegten Befunde könnten ein erstes Beispiel dafür sein, daß ein Medikament seinen Stoffwechsel auch in Submilligrammdosen steigert.

ZUSAMMENFASSUNG

In Untersuchungen mit nicht markiertem Digoxin und dem ^{3}H-markierten Glykosid hoher spezifischer Aktivität wurde das pharmakokinetische Verhalten von Digoxin beim Kaninchen analysiert.

In einer ersten Gruppe war der radioimmunologisch bestimmte Blutspiegelverlauf über die Zeit nach einmaliger, intravenöser Gabe von 0,8 mg Digoxin mit einem offenen, linearen Drei-Kompartment-Modell vereinbar. Die maßgebliche Halbwertzeit betrug 14,8 $\pm$ 3,2 Stunden. Nach täglicher Injektion von 0,8 mg Digoxin über eine Woche fielen die mittleren 12h-Konzentrationen im Serum bei 8 weiblichen Kaninchen von 0,62 $\pm$ 0,06 ng/ml nach der ersten Dosis auf 0,23 $\pm$ 0,09 ng/ml nach der siebten Dosis und lagen damit signifikant niedriger als die vorausberechneten Werte ($p < 0,005$). Die 24h-Werte verhielten sich entsprechend.

Eine 2. Gruppe von Kaninchen erhielt 13 Tage lang eine tägliche Injektion von 0,2 mg Digoxin pro kg Körpergewicht. Die 1. und 13. Dosis enthielten 216 μC 12-α-^{3}H-Digoxin. Nach beiden Injektionen war die Kinetik der Gesamtserumradioaktivität triexponentiell, und die kinetischen Parameter unterschieden sich nicht signifikant. Die Eliminationshalbwertzeit der Serumaktivität betrug 33,9 $\pm$ 1,8 Stunden. Nach beiden Dosen konnten innerhalb von 96 Stunden nach der Injektion jeweils 15 % der Radioaktivität im Urin und 75 % im Stuhl nachgewiesen werden. Die chloroformextrahierbare Radioaktivität in Serum und Urin lag nach der ersten Dosis höher als nach der zweiten, die Unterschiede erreichten jedoch im allgemeinen keine Signifikanz. Nach enzymatischer Spaltung mit Glucuronidase-Sulfatase und saurer Hydrolyse verdoppelte sich der Anteil der chloroformextrahierbaren Aktivität nach beiden Dosen.

Die Ergebnisse zeigen, daß das Kaninchen Digoxin ausgiebig verstoffwechselt. Die radioimmunologisch gemessene Clearance ist größer als jene, die sich aus der Serumaktivität errechnet.

Die Spiegel des nicht markierten Glykosids fallen bei wiederholter Applikation stetig. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß Digoxin beim Kaninchen seinen eigenen Stoffwechsel stimuliert.

Tabelle 1: Pharmakokinetische Parameter nach einmaliger intravenöser Gabe von 0,8 mg Digoxin (Radioimmunoassay).

Tier	$t_{1/2\gamma_1}$ (h)	$t_{1/2\gamma_2}$ (h)	$t_{1/2\gamma_3}$ (h)	V_1 (l/kg)	V_d (l/kg)	Totale Clearance (ml/min)
1	0,181	2,24	10,33	0,88	37,26	138,50
2	0,193	1,55	18,49	1,65	73,50	166,90
3	0,263	1,51	14,30	2,47	62,29	155,30
5	0,162	1,72	24,41	0,59	52,32	89,30
8	0,454	-	6,29	2,97	28,70	161,80
$\bar{x}$	0,251	1,76	14,76	1,71	50,81	142,40
SEM	0,050	0,17	3,16	0,45	8,15	14,12
Mittelwerts-kurve	0,248	1,69	13,05	1,68	50,34	149,10

Tabelle 2: Gemessene und vorausberechnete Serumdigoxinkonzentrationen (in ng/ml) jeweils 12 und 24 Stunden nach täglicher intravenöser Injektion von 0,8 mg Digoxin über eine Woche (Radioimmunoassay).

	männliche Kaninchen (n = 5)				weibliche Kaninchen (n = 8)			
	12h		24h		12h		24h	
Tag	gemessen ($\bar{x} \pm$ SEM)	errechnet	gemessen ($\bar{x} \pm$ SEM)	errechnet	gemessen ($\bar{x} \pm$ SEM)	errechnet	gemessen ($\bar{x} \pm$ SEM)	errechnet
1	0,53 ± 0,08	0,53	0,22 ± 0,09	0,22	0,62 ± 0,06	0,62	0,21 ± 0,03	0,21
2	0,60 ± 0,08	0,62	0,11 ± 0,05[1]	0,26	0,82 ± 0,17	0,69	0,26 ± 0,06	0,23
3	0,45 ± 0,09	0,64	0,05 ± 0,03[4]	0,27	0,64 ± 0,05	0,70	0,16 ± 0,07	0,24
4	0,41 ± 0,09	0,64	0,11 ± 0,03[3]	0,27	0,69 ± 0,12	0,70	0,19 ± 0,06	0,24
5	0,38 ± 0,11	0,64	0,09 ± 0,04[2]	0,27	0,57 ± 0,16	0,70	0,17 ± 0,06	0,24
6	0,25 ± 0,06[4]	0,64	0,11 ± 0,04[2]	0,27	0,34 ± 0,07[4]	0,70	0,16 ± 0,08	0,24
7	0,19 ± 0,07[4]	0,64	0,02 ± 0,02[4]	0,27	0,23 ± 0,09[4]	0,70	0,09 ± 0,04[3]	0,24

1) $p < 0,05$, 2) $p < 0,025$, 3) $p < 0,01$, 4) $p < 0,005$.
(Einseitiger t-Test der Differenz zwischen gemessenen und errechneten Konzentrationen)

Tabelle 3: Pharmakokinetische Parameter nach einmaliger intravenöser Gabe von 0,2 mg Digoxin/kg; davon 0,1 mg = 216 µC ^{3}H-Digoxin.
1. Injektion von ^{3}H-Digoxin.

Tier	$t_{1/2\gamma_1}$ (h)	$t_{1/2\gamma_2}$ (h)	$t_{1/2\gamma_3}$ (h)	V_1 (l/kg)	V_d (l/kg)	Totale Clearance (ml/min)
1	0,16	4,17	29,05	5,85	54,79	84,97
2	0,15	5,07	28,88	9,53	65,37	86,28
3	0,16	2,08	41,04	8,80	107,62	98,52
4	0,11	3,54	39,03	5,80	74,92	94,12
5	0,17	5,92	31,08	6,97	65,34	82,56
6	-	1,51	34,94	18,34	59,25	78,37
7	0,18	8,21	41,91	5,85	59,62	61,60
8	0,28	2,48	30,54	6,50	68,22	96,52
$\bar{x}$	0,18	4,12	33,92	8,46	69,39	85,36
SEM	0,02	0,79	1,81	1,50	5,88	4,22
Mittelwerts-kurve	0,30	4,01	30,14	10,29	62,47	85,50

Tabelle 4: Pharmakokinetische Parameter nach 13-tägiger intravenöser Gabe von 0,2 mg Digoxin/kg. Die 13. Dosis enthielt 0,1 mg = 216 µC ^{3}H-Digoxin. 2. Injektion von ^{3}H-Digoxin (13. Tag).

Tier	$t_{1/2\gamma_1}$ (h)	$t_{1/2\gamma_2}$ (h)	$t_{1/2\gamma_3}$ (h)	V_1 (l/kg)	V_d (l/kg)	Totale Clearance (ml/min)
1	0,16	3,01	33,58	5,53	69,10	92,70
2	0,06	5,97	42,87	3,27	78,73	69,38
3	0,16	2,08	41,01	8,88	108,56	99,37
4	0,18	2,98	36,10	7,27	87,82	103,97
5	0,21	3,63	32,70	8,28	80,18	96,32
6	1,22	9,74	78,77	18,50	101,25	59,38
7	0,11	4,32	216,61	4,04	42,37	8,48
8	0,26	1,24	36,87	7,11	80,13	77,21
$\bar{x}$	0,29	2,21	43,12 [1)]	7,35	86,54 [1)]	85,47 [1)]
SEM	0,13	0,67	6,10	1,78	5,23	6,39
Mittelwerts-kurve	0,19	3,69	35,40	8,01	71,87	83,80

1) Tier 7 wurde bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt.

LITERATUR

1. Abshagen, U.:
Effects of pretreatment with spironolactone on pharmacokinetics of 4'''-methyldigoxin in rats.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 278, 91, 1973.

2. Augsberger, A.:
Quantitatives zur Therapie mit Herzglykosiden, I. Mitt.: Die Variabilität von Glykosidbedarf und -toleranz.
Med. Welt 20, 1471, 1951.

3. Augsberger, A.:
Quantitatives zur Therapie mit Herzglykosiden, Kumulation und Abklingen der Wirkung.
Klin. Wschr. 32, 945, 1954.

4. Battermann, R.C., De Graff, A.C.:
Comparative study on the use of the purified digitalis glycosides, digoxin, digitoxin and lanatoside C, for the management of ambulatory patients with congestive heart failure.
Amer. Heart J. 34, 663, 1947.

5. Benet, L.Z.:
General treatment of linear mammillary models with elimination from any compartments as used in pharmacokinetics.
J. Pharm. Sci. 61, 536, 1972.

6. Bertler, A., Redfors, A.:
An improved method of estimating digoxin in human plasma.
Clin. Pharmacol. Ther. 11, 665, 1970.

7. Bertler, A., Redfors, A.:
The ^{86}Rb method for digoxin assay. Comparison with radioimmunoassay. Symposion on Digitalis, Ed. O. Storstein Gyldendal Norsk Forlag 64, 1973.

8. Bodem, G.:
Untersuchungen zum Verhalten von Herzglykosiden im menschlichen Organismus nach akuter und chronischer Verabreichung.
Habilitationsschrift, Med. Fakultät der Rhein. Friedr. Wilh. Universität Bonn, 1974.

9. Boston Collaborative Drug Surveillance Program:
Relation between digoxin arrhythmias and ABO blood groups.
Circulation 45, 352, 1972.

10. Bray, G.A.:
A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.
Anal. Biochem. 1, 279, 1960.

11. Buck, S.H., Lage, G.L.:
Possible mechanism of the prevention of digitoxin toxicity by spironolactone in the mouse.
Arch. int. Pharmacodyn. 189, 192, 1971.

12. Castle, M.C., Lage, G.L.:
Enhanced biliary excretion of digitoxin following spironolactone as it relates to the prevention of digitoxin toxicity.
Chem. Pathol. Pharmacol. 5, 99, 1973.

13. Castle, M.C., Lage, G.L.:
Excretion of ^{3}H-digitoxin and its metabolites following spironolactone pretreatment in rats.
Drug Metab. Dis. 1, 590, 1973.

14. Conney, A.H.:
Pharmacological implications of microsomal enzyme inductions.
Pharmacol. Rev. 19, 317, 1967.

15. Conney, A.H.:
Drug metabolism and therapeutics.
N. Engl. J. Med. 280, 653, 1969.

16. Conney, A.H., Burns, J.J.:
Metabolic interactions among environmental chemicals and drugs.
Science 178, 576, 1972.

17. Dengler, H.J., Bodem, G., Wirth, K.:
Pharmacokinetic and metabolic studies with lanatoside C, α - and ß-acetyldigoxin and digoxin in man.
Proc. 5th Int. Congr. Pharmacology, San Francisco 1972 vol. 3, 112-126 (Karger, Basel 1973).

18. Dengler, H.J., Bodem, G., Wirth, K.:
Pharmakokinetische Untersuchungen mit ^{3}H-Digoxin und ^{3}H-Lanatosid beim Menschen.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 64, 1973.

19. Doherty, J.E., Perkins, W.H., Mitchell, G.K.:
Tritiated digoxin studies in human subjects.
Arch. Intern. Med. 108, 531, 1961.

20. Doherty, J.E., Perkins, W.H.:
Studies with tritiated digoxin in human subjects after intravenous administration.
Am. Heart J. 63, 528, 1962.

21. Doherty, J.E.:
The clinical pharmacology of digitalis glycosides: A Review.
Amer. J. Med. Sci. 255, 382, 1968.

22. Doherty, J.E.:
Digitalis assay by salivary electrolytes.
N. Engl. J. Med. 285, 916, 1971.

23. Dost, F.H.:
Grundlagen der Pharmakokinetik.
2. Auflage (Thieme, Stuttgart, 1968).

24. Evered, D.C., Chapman, L.:
Plasma digoxin concentration and digoxin toxicity in hospital patients.
Brit. Heart J. 33, 540, 1971.

25. Friedman, M., Bine, R., Jr.:
Employment of the embryonic duck heart for the detection of minute amounts of a digitalis glycoside (lanatoside C).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 64, 162, 1947.

26. Gelehrter, T.M.:
Enzyme induction.
N. Engl. J. Med. 294, 589, 1976.

27. Gibaldi, M., Nagashima, R., Levy, G.:
Relationship between drug concentration in plasma or serum and amount of drug in the body.
J. Pharm. Sci. 58, 193, 1969.

28. Gibaldi, M., Weintraub, H.:
Some considerations as to the determination and significance of biologic half-life.
J. Pharm. Sci. 60, 624, 1971.

29. Gibaldi, M., Perrier, D.:
Pharmacokinetics.
Marcel Dekker, Inc., New York, 1975.

30. Giuffra, L.J., Tseng, H.L.:
Some clinical aspects of digitalis intoxication.
NY State J. Med. 52, 581, 1952.

31. Gladtke, E., v. Hattingberg, H.M.:
Pharmakokinetik (Eine Einführung).
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1973.

32. Gotsman, M.S., Schrire, V.:
Toxicity - a frequent complication of digitalis therapy.
S. Afr. Med. J. 40, 590, 1966.

33. Grahame-Smith, D.G., Everest, M.S.:
Measurement of digoxin in plasma and its use in diagnosis of digoxin intoxication.
Br. Med. J. 1, 286, 1969.

34. Greenblatt, D.J., Duhme, D.W., Koch-Weser, J., Smith, T.W.:
Evaluation of digoxin bioavailability in single-dose studies.
N. Engl. J. Med. 289, 651, 1973.

35. Greenblatt, D.J., Koch-Weser, J.:
Clinical pharmacokinetics.
N. Engl. J. Med. 293, 702-705, 964-970, 1975.

36. Harrison, C.E., Jr., Brandenburg, R.O., Ongley, P.A., Orvis, A.L., Owen, C.A., Jr.:
The distribution and excretion of tritiated substances in experimental animals following the administration of digoxin-^{3}H.
J. Lab. Clin. Med. 67, 764, 1966.

37. Hatcher, R.A.:
The persistence of action of the digitalins.
Arch. Intern. Med. 10, 268, 1912.

38. Herrmann, I., Portius, H.F., Repke, K.:
Untersuchungen zur Ursache der Digitalisresistenz der Kröte.
Arch. exp. Path. Pharmakol. 247, 1, 1964.

39. Herrmann, I., Repke, K.:
Entgiftungsgeschwindigkeit und Kumulation von Digitoxin bei verschiedenen Spezies.
Arch. exp. Path. Pharmakol. 247, 19, 1964.

40. Herrmann, I., Repke, K.:
Speziesunterschiede in der Biotransformation von Digitoxin.
Arch. exp. Path. Pharmakol. 247, 35, 1964.

41. Herrmann, G.R.:
Digitoxicity in the aged: recognition, frequency and management.
Geriatrics 21, 109, 1966.

42. Hilton, J.G.:
A polarographic determination of digitoxin.
Science, 110, 526, 1949.

43. Hurwitz, N., Wade, O.L.:
Intensive hospital monitoring of adverse reactions to drugs.
Br. Med. J. 1, 531, 1969.

44. Jeliffe, R.W.:
New derivative for gas-liquid chromatography of digitoxin and digitoxigenin.
Circulation 28, 743, 1963.

45. Jeliffe, R.W., Blankenhorn, D.A.:
Gas chromatography of digitoxigenin and digoxigenin.
J. Chromatogr. 121, 268, 1963.

46. Jeliffe, R.W.:
An ultramicro-fluorescent spray reagent for detection and quantification of cardiotonic steroids on thin-layer-chromatograms.
J. Chromatogr. 27, 172, 1967.

47. Jeliffe, R.W., Buell, J., Kalaba, R.:
Reduction of digitalis toxicity by computer-assisted glycoside dosage regimes.
Ann. Intern. Med. 77, 891, 1972.

48. Kaihara, S., Leand, P.M.:
A possible mechanism of the species difference in digitalis toxicity.
Clin. Res. 15, No. 2, 209, 1967.

49. Kaihara, S., Wagner, H.N., Jr.:
Myocardial binding of digoxin as a mechanism of species difference of digitalis toxicity.
Circulation 38, No. 4, VI-110, 1968.

50. Kaiser, F.:
Die papierchromatographische Trennung von Herzgiftglykosiden.
Chem. Ber. 88, 556, 1955.

51. Koup, J.R., Greenblatt, D.J., Jusko, W.J., Smith, T.W., Koch-Weser, J.:
Pharmacokinetics of digoxin in normal subjects after intravenous bolus and infusion doses.
J. Pharmacokin. Biopharm. 3, 181, 1975.

52. Kramer, W.G., Lewis, R.P., Cobb, T.C., Forester, W.F., Jr., Visconti, J.A., Wanke, L.A., Boxenbaum, H.G., Reuning, R.H.: Pharmacokinetics of digoxin: comparison of a two - and a three-compartment model in man.
J. Pharmacokin. Biopharm. 2, 299, 1974.

53. Lage, G.L., Spratt, J.L.:
Species and sex variation in the hepatic metabolism of ^{3}H-digoxin in vitro.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 159, No. 1, 182, 1968.

54. Larbig, D., Kochsiek, K.:
Zur radioimmunchemischen Bestimmung von Digoxin und Digoxinderivaten.
Dtsch. med. Wschr. 97, 1310, 1972.

55. Lauterbach, F.:
Metabolismus und enterale Resorption herzwirksamer Glykoside.
Arch. Pharmakol. Exp. Pathol. 263, No. 1, 26, 1969.

56. Levy, G., Gibaldi, M.:
Handbuch der Exp. Pharmakologie XXVIII/3
Concepts in biochemical pharmacology, Chapter 59, (Pharmacokinetics), Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1975.

57. Louven, B.:
Medikamentöse Herztherapie nach stumpfem Thoraxtrauma.
Habilitationsschrift, Med. Fakultät der Rhein. Friedr. Wilh. Universität Bonn 1973.

58. Marcus, F.I., Peterson, A.S., Sadel, A.F., Scully, J., Kapadia, G.G.:
Metabolism of tritiated digoxin in renal insufficiency.
Circulation 30, Suppl. 3, 162, 1964.

59. Marquardt, D.W.:
An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters.
J. Soc. Ind. Appl. Math. 11, 431, 1963.

60. Mayersohn, M., Gibaldi, M:
Mathematical methods in pharmacokinetics, II. Solution of the two-compartment open model.
Amer. J. pharm. Educ. 35, 19, 1971.

61. Nevasaari, K., Alakare, B., Karki, N.T.:
Different effects of microsomal enzyme inducers on the biliary excretion of digoxin.
Acta Pharmacol. Toxicol. 39, 442, 1976.

62. Nüesch, E.:
Proof of the general validity of Dost's law of corresponding areas.
Europ. J. clin. Pharmacol. 6, 33, 1973.

63. Nyberg, L., Anderson, K.-E., Bertler, A.:
Bioavailability of digoxin from tablets. II. Radioimmunoassay and disposition pharmacokinetics of digoxin after intravenous administration.
Acta Pharm. Suec. 11, 459, 1974.

64. Ochs, H.R., Bodem, G., Louven, B., Bales, G., Greenblatt, D.J., Smith, T.W.:
Increased Clearance of digoxin in rabbits during repeated administration.
im Druck, 1977.

65. Ogilvie, R.I., Ruedy, J.:
Adverse drug reactions during hospitalization.
Can. Med. Assoc. J. 97, 1450, 1967.

66. Ogilvie, R.I., Ruedy, J.:
An educational program in digitalis therapy.
JAMA 222, 50, 1972.

67. Okita, G.T.:
Species difference in duration of action of cardiac glycosides.
Fed. Proc. 26, 1125, 1967.

68. Remmer, H.:
Gewöhnung an Hexobarbital durch beschleunigten Abbau.
Arch. Int. Pharmacodyn. 152, 346, 1964.

69. Remmer, H.:
Induction of drug metabolizing enzyme system in the liver.
Europ. J. clin. Pharmacol. 5, 116, 1972.

70. Repke, K.:
Metabolism of cardiac glycosides.
Proc. 1st Int. Pharm. Meet. Pergamon Press Oxford, 1963.

71. Repke, K.:
Effect of digitalis on membrane adenosine triphosphatase of cardiac muscle.
Proc. 2nd Int. Pharm. Meet. Pergamon Press Oxford 1965.

72. Repke, K.:
Stoffwechsel und Wirkung von Digitalisglykosiden.
Proc. 2nd Int. Pharm. Meet. Pergamon Press Oxford 1965.

73. Repke, K., Est, M., Portius, H.F.:
Über die Ursache der Speziesunterschiede in der Digitalisempfindlichkeit.
Bioch. Pharmacol. 14, 1785, 1965.

74. Riegelmann, S., Loo, J.C.K., Rowland, M.:
Shortcomings in pharmacokinetic analysis by conceiving the body to exhibit properties of a single compartment.
J. Pharm. Sci. 57, 117, 1968.

75. Rodensky, P.L., Wassermann, F.:
Observations on digitalis intoxication.
Arch. Intern. Med. 108, 171, 1961.

76. Russell, J.Q., Klaassen, C.D.:
The biliary excretion of cardiac glycosides in rats, rabbits and dogs.
Pharmacologist 13, No. 2, 195, 1971.

77. Russell, J.Q.:
A species comparison of the biliary excretion of cardiac glycosides.
Dissertation Abstr. Intern. B 33, No. 6, 2731, 1972.

78. Russell, J.Q., Klaassen, C.D.:
Biliary excretion of cardiac glycosides.
J. Pharm. Exp. Ther. 186, No. 3, 455, 1973.

79. Schmidt, D.H., Butler, V.P., Jr.:
Immunological protection against digoxin toxicity.
J. Clin. Invest. 50, No. 4, 866, 1971.

80. Schmidt, D.H., Kaufmann, B.M., Butler, V.P., Jr.:
Persistence of hapten-antibody complexes in the circulation of immunized animals after a single intravenous injection of hapten.
J. Exp. Med. 139, 278, 1974.

81. Schott, A.:
Observations on digitalis intoxication - a plea.
Postgrad. Med. J. 40, 628, 1964.

82. Seipel, H., Hueber, E.F., Deutsch, E., Lutz, U., Wichtl, M., Jentzsch. K.:
Quantitative Digitoxinbestimmung im Blut routinemäßig digitalisierter Patienten.
Klin. Wschr. 46, 23, 1257, 1968.

83. Selye, H., Jelniek, J., Krajny, M.:
Prevention of digitoxin poisoning by various steroids.
J. Pharm. Sci. 58, 1055, 1969.

84. Selye, H., Krajny, M., Savoie, L.:
Digitoxin poisonning: prevention by spironolactone.
Science 164, 842, 1969.

85. Shapiro, S., Slone, D., Lewis, G.P. et al.:
The epidemiology of digoxin. A study in three Boston hospitals.
J. Chronic. Dis. 22, 361, 1969.

86. Smith, T.W., Butler, V.P., Jr., Haber, E.:
Determination of therapeutic and toxic serum digoxin concentrations by radioimmunoassay.
N. Engl. J. Med. 281, 1212, 1969.

87. Smith, T.W., Butler, V.P., Jr., Haber, E.:
Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glycoside digoxin.
Biochemistry 9, 331, 1970.

88. Smith, T.W., Haber, E.:
Current techniques for serum or plasma digitalis assay and their potential clinical application.
Amer. J. med. Sci. 259, 301, 1970.

89. Smith, T.W., Haber, E.:
Digitalis (in four parts).
N. Engl. J. Med. 289, 945-952, 1010-1015, 1063-1072, 1125-1129, 1973.

90. Solomon, H.M.:
Interaction of digitoxin with other drugs.
Symposium on digitalis. Ed. O. Storstein, Gyldendal Norsk Forlag 70, 1973.

91. Solymoss, B., Toth, S., Varga, S., Krajny, M.:
Influence of spironolactone and other steroids on the plasma level of digitoxin.
In Myocardiology, Vol. 1, ed. by E. Bajusz and G. Rona, pp. 605-611, University Park Press, Baltimore, 1972.

92. Solymoss, B., Toth, S., Varga, S., Selye, H.:
Protection by spironolactone and oxandrolone against chronic digitoxin or indomethacin intoxication.
Toxicol. appl. Pharmacol. 18, 586, 1971.

93. Sumner, D.J., Russell, A.J., Whiting, B.:
Digoxin pharmacokinetics: multicompartmental analysis and its clinical implications.
Br. J. Clin. Pharmacol. 3, 221, 1976.

94. Tawakkol, A.A., Nutter, D.O., Massumi, R.A.:
A prospective study of digitalis toxicity in a large city hospital.
Med. Ann. D. C. 36, 402, 1967.

95. Tschoepe, E.:
Excretion of tritiated cardiac glycosides by the perfused rabbit kidney.
Arch. Pharmacol. 270, Suppl. 1, R 147, 1971.

96. Usanis, R.A.:
NLIN--Nonlinear least squares estimation of parameters (Library Services Series Document No. LSR-089-1), Triangle Universities Computation Center, Research Triangle Park, N.C., 1972.

97. Wagner, J.G.:
Biopharmaceutics and relevant pharmacokinetics.
Drug Intelligence Publications: Hamilton, Ill., 1971.

98. Wagner, J.G.:
Fundamentals of clinical pharmacokinetics.
Drug Intelligence Publications, Hamilton Ill., 1975.

99. v. Wartburg, A., Kalberger, F., Rutschmann, J.:
Tritium-labelled cardiac glycosides: Digoxin-(12α-^{3}H).
Biochem. Pharmacol. 14, 1883, 1965.

100. Watson, E., Kalman, S.M.:
Assay of digoxin in plasma by gaschromatography.
J. of Chromatography 56, 209, 1971.

101. Wilson, L.E., Johnson, S.A., Perkins, W.H., Ripley, J.E.:
Gas chromatographic analysis of cardiac glycosides and related compounds.
Anal. Chem. 39, 40, 1967.

102. Wirth, K., Bodem, G., Dengler, H.J.:
Resorption, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digoxin, und digoxinverwandten Glykosiden.
Symposion über herzwirksame Glykoside 3.-5. 12. 1970.
Urban & Schwarzenberg München - Berlin - Wien 51, 1972.

103. Wirth, K.E., Fröhlich, J.C.:
Effect of spironolactone on excretion of ^{3}H-digoxin and its metabolites in rats.
Europ. J. Pharmacol. 29, 43, 1974.

104. Yalow, R.S., Berson, S.A.:
Immunoassay of plasma insulin.
Meth. biochem. Anal. 12, 69, 1964.

Für die vielfach gewährte Unterstützung bei der Entstehung dieser Dissertation möchte ich

Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Bodem,
Herrn Prof. Dr. H. J. Dengler,
Herrn Priv.-Doz. Dr. B. Louven,
Frau U. Neubüser und
Herrn Dr. H. R. Ochs

herzlich danken.

L E B E N S L A U F

Am 5. Juni 1949 wurde ich als zweites Kind von Alois Bales und seiner Ehefrau Anna, geb. Konz, in Trier geboren.
In Pluwig, einem Dorf in der Nähe von Trier, wuchs ich auf und besuchte die Volksschule St. Johannes. Meine Gymnasialzeit am humanistischen Friedrich-Wilhelm-Gymnasium in Trier dauerte von 1960 bis 1968. Die ersten sechs Jahre dieser Zeit wohnte ich im Bischöflichen Konvikt in Trier. Nach dem Abitur leistete ich meinen 18-monatigen Militärdienst.
Zum Wintersemester 1969/70 immatrikulierte ich mich an der Universität Bonn in den Fächern Mathematik und Physik.
Nach dem Vordiplom in Physik, Sommersemester 1971, erhielt ich die Zulassung für das Fach Medizin zum Wintersemester 1971/72. Im Sommersemester 1976 bestand ich das medizinische Staatsexamen.
Mein besonderes Interesse gilt der Inneren Medizin.